



**Valorisation de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre  
Optimisation de la production d'extraits à l'eau chaude et  
caractérisation de leur potentiel antioxydant**

**Thèse**

**Thibaud Geoffroy**

**Doctorat en sciences du bois**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Thibaud Geoffroy, 2018

**Valorisation de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre**  
**Optimisation de la production d'extraits à l'eau chaude et**  
**caractérisation de leur potentiel antioxydant**

**Thèse**

**Thibaud Geoffroy**

Sous la direction de :

**Tatjana Stevanovic**, directrice de recherche

**Yves Fortin**, codirecteur de recherche

## Résumé

Résidu généré en fortes quantités par l'industrie forestière, l'écorce est principalement valorisée par combustion pour la production d'énergie. Pourtant, des projets de bioraffineries sont en développement croissant pour proposer de nouvelles voies de valorisation telle que l'extraction. L'écorce pouvant contenir des molécules extractibles potentiellement bioactives en quantités appréciables, les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique s'intéressent de près à de telles initiatives. Cette vaste gamme de composés bioactifs propose en effet des alternatives séduisantes à des ingrédients de synthèse de moins en moins prisés. De tels extractibles démontrant des activités antioxydantes, antibactériennes, anti-cancer ou encore anti-inflammatoires ont été isolés au sein de l'écorce des deux essences d'érables, *Acer rubrum* L. (érable rouge) et *Acer saccharum* Marsh. (érable à sucre). Ces hétérosides phénoliques ainsi que d'autres extractibles d'intérêt sont susceptibles d'être extraits à l'eau, un solvant vert apprécié pour des applications finales ayant trait à la santé humaine.

La thèse présentée s'intéresse donc à la valorisation de l'écorce de l'érable rouge et de l'érable à sucre par récupération et caractérisation d'extractibles hydrosolubles potentiellement antioxydants. Le premier axe de la recherche est centré sur l'optimisation d'un procédé d'extraction à l'eau chaude. En variant les paramètres de granulométrie de l'écorce, de température, de durée de l'extraction et de ratio écorce/solvant, le but a été d'obtenir des valeurs optimales de rendement, teneur en phénols totaux, capacité antioxydante et consommation énergétique estimée. Partant des résultats obtenus, les conditions suivantes : granulométrie de 250–500  $\mu\text{m}$ , température de 90°C, durée de 1 h, ratio écorce/solvant de 1/10, ont été jugées pertinentes pour une mise à l'échelle. Ainsi, des traitements post-extraction ont été investigués à échelle laboratoire pilote pour la production d'extraits secs. Combinant plusieurs méthodes de concentration (osmose inverse, évaporation sous vide) et de séchage (atomisation, lyophilisation), ces traitements ont été évalués selon différentes variables réponses : récupération de l'extrait, capacité antioxydante, teneurs en protéines, en composés phénoliques, en sucres totaux et énergie nécessaire aux opérations unitaires des différents procédés. Pour les extraits des deux essences d'érable, les combinaisons osmose inverse/atomisation et osmose inverse/lyophilisation se sont avérées les plus prometteuses. De qualité supérieure en termes d'antioxydants phénoliques, l'extrait d'écorce d'érable rouge lyophilisé a été choisi pour l'investigation de tels composés par criblage antioxydant. L'approche basée sur des techniques couplant test antioxydant *in vitro* au radical DPPH<sup>•</sup> et séparation chromatographique par HPLC a permis de mieux comprendre les mécanismes radicalaires en présence des dérivés galloyl-glucitols de l'érable rouge. Le phénomène d'auto-oxydation mis en évidence chez ces dérivés testés purs n'a pas été observé lorsque ceux-ci ont été évalués dans des mélanges tertiaires ou directement dans l'extrait. L'effet de mixture/matrice associé à ce comportement a orienté la suite des travaux vers l'étude de fractions de composés plutôt que vers l'isolement de composés purs. Pour cela, la technique d'ultrafiltration a été investiguée pour la production de fractions concentrées. Ce dernier volet a donc permis d'explorer des classes de composés peu, voire non étudiés au sein des deux érables (protéines, tannins). Même si les résultats demeurent préliminaires, la caractérisation

des tannins a révélé certaines similarités chez les deux essences, à savoir la présence de tannins de type proanthocyanidine en quantités comparables. En termes de différences, contrairement à l'érable à sucre, l'érable rouge semble riche en gallotannins de hautes masses moléculaires. Toutefois, des analyses complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ce résultat.

Au final, cette thèse fournit une base substantielle pour l'établissement d'une voie de valorisation viable des extractibles des écorces d'érable rouge et d'érable à sucre. Elle propose un défrichage des principales problématiques intrinsèques à la production d'extraits pour des applications alimentaire, cosmétique ou pharmacologique. Si les connaissances des composés présents dans l'écorce d'érable ont été améliorées, de nombreuses étapes restent nécessaires à la création d'une filière de bioraffinerie pérenne. Pour aller dans ce sens, la suite de la recherche prévoit, entre autres, des tests de toxicité et d'activités *in vivo*, ainsi que l'étude de l'intégration des extraits dans des matrices alimentaires.

## Abstract

Bark is a high-volume residue from the forest industry that is mostly incinerated for its calorific value. However, biorefineries are increasingly gaining importance by providing new alternatives, such as solvent extraction. As bark is usually rich in extractives susceptible to exhibit bioactivities, agro-food, cosmetic and pharmaceutical industries keep a close eye on such opportunities. This high diversity of bioactive natural compounds in extracts provides a valuable substitute to synthetic ingredients, currently losing popularity. Phenolic extractives associated to antioxidant, antibacterial, anti-cancer or anti-inflammatory activities have been found in red maple (*Acer rubrum* L.) and sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) bark. In addition to other promising extractives, these phenolic glycosides could be recovered using water. This non-toxic extraction solvent is usually privileged for human-health related applications.

This thesis investigates the valorisation of red maple and sugar maple bark by recovery and antioxidant characterisation of their water-soluble extractives. First, the research was focused on hot-water extraction optimisation. By varying several parameters (particle size of bark, extraction temperature and duration, bark/solvent ratio), optimal values were determined in terms of extraction yield, phenolic content, antioxidant capacity and estimated energy consumption. From these results, a 250–500  $\mu\text{m}$  particle size, 90°C temperature, 1 h duration and a 1/10 bark/water ratio were found relevant for a scale-up. Therefore, post-extraction treatments were investigated at semi-pilot scale aiming to produce dry extracts. Combining concentration (reverse osmosis, vacuum evaporation) and drying (spray-drying, freeze-drying) methods, treatments were evaluated based upon several response variables: extract recovery, antioxidant capacity, protein, phenolic and carbohydrate contents and power consumption induced by the operation units of the process. In regards to these variables, extracts from both maple species seemed more potent when processed using reverse osmosis, associated to spray-drying or freeze-drying. The higher potential in terms of antioxidant phenolics determined for the red maple bark extract obtained using reverse osmosis and freeze-drying led us to perform antioxidant screening on this extract. An approach based on *in vitro* DPPH<sup>•</sup> radical scavenging test associated to HPLC separation allowed for a better understanding of radical scavenging mechanisms related to galloyl-glucitol derivatives from red maple. Autoxidation of these compounds tested individually was not observed when evaluated in a tertiary mixture or in the crude extract. This mixture/matrix effect helped us define the next step as a study focusing rather on the production of fractions than on the isolation of pure compounds. To this end, ultrafiltration was studied as a tool for extract fractionation. Thus, this last part of the project allowed us to explore different classes of compounds in both sugar and red maple (proteins, tannins), which have rarely been studied. Although preliminary, the obtained results indicated the similarities between the characteristics of tannins found in both species *i.e.* proanthocyanidins in comparable amounts. However, only the high molecular fraction from red maple bark extract seemed to contain substantial amounts of high-molecular-weight gallotannins. Supplementary analyses would be required to confirm this result.

To conclude, this thesis provides solid information to promote the extraction of red and sugar maple bark at a commercial level. This work offers valuable findings and insights about extract production for application in foods, cosmetics or pharmaceuticals. The results obtained help enhance the knowledge about maple bark phytochemicals. Yet, further studies would be required before creating a sustainable biorefinery project based on maple bark. Such investigations, including *in vivo* toxicity, activity testing, as well as studies about food enrichment using maple extracts are planned for the continuation of this research.

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations et acronymes principaux.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Dédicace, épigraphes .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>xix</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Chapitre 1 – État de l’art .....</b>	<b>3</b>
I.1. Le genre <i>Acer</i> .....	3
I.1.1. <i>Classification</i> .....	3
I.1.2. <i>Acer saccharum Marsh.</i> .....	4
I.1.3. <i>Acer rubrum L.</i> .....	5
I.2. L’écorce et ses extractibles .....	6
I.2.1. <i>Anatomie de l’écorce</i> .....	6
I.2.2. <i>Composition chimique de l’écorce</i> .....	7
I.2.3. <i>Les extractibles potentiels de l’écorce</i> .....	9
I.2.3.1. <i>Voies de biosynthèse</i> .....	9
I.2.3.2. <i>Les extractibles hydrosolubles</i> .....	12
I.2.3.3. <i>Les extractibles lipophiles</i> .....	27
I.2.3.4. <i>Mise en évidence et caractérisation</i> .....	29
I.2.3.5. <i>Bioactivités des extractibles</i> .....	44
I.3. <i>Valorisation des extractibles de l’écorce par la bioraffinerie</i> .....	48
I.3.1. <i>La bioraffinerie : exemples et marché</i> .....	48
I.3.2. <i>Les techniques d’extraction</i> .....	50
I.3.2.1. <i>Concepts de l’extraction et paramètres importants</i> .....	50
I.3.2.2. <i>Extraction solide–liquide</i> .....	51
I.3.2.3. <i>Extraction par fluide sous haute pression</i> .....	53
I.3.2.4. <i>Extraction par fluide supercritique, extraction par entraînement à la vapeur</i> .....	54
I.3.3. <i>Traitements post-extraction des extraits</i> .....	54
I.3.3.1. <i>Techniques de concentration des extractibles</i> .....	55
I.3.3.2. <i>Techniques de séchage</i> .....	64
I.4. <i>Présentation des objectifs de recherche</i> .....	68
<b>II. Chapitre 2 – Optimisation à échelle laboratoire de l’extraction à l’eau chaude d’écorce d’érable.....</b>	<b>70</b>
II.1. <i>Introduction</i> .....	71

II.2. Materials and methods.....	72
II.2.1. Material sampling .....	72
II.2.2. Experimental design .....	73
II.2.3. Extractions.....	73
II.2.4. Total phenolic content .....	73
II.2.5. Antioxidant capacity.....	74
II.2.6. Energy consumption (pilot scale).....	74
II.2.7. Statistical analysis.....	75
II.3. Results and discussion .....	75
II.3.1. Determination of extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity	75
II.3.2. Estimation of energy consumption .....	78
II.3.3. Principal component analysis .....	79
II.4. Conclusions .....	82
<b>III. Chapitre 3 – Optimisation d’un procédé de production d’extraits d’écorce d’érable comme source de composés antioxydants, phénoliques et glucidiques.....</b>	<b>83</b>
III.1. Introduction .....	84
III.2. Experimental .....	86
III.2.1. Samples and reagents.....	86
III.2.2. Unit operations of the process .....	88
III.2.3. Experimental design.....	88
III.2.4. Response variables.....	88
III.2.5. Antioxidant potential of the optimal maple extracts .....	90
III.2.6. Statistical analyses .....	91
III.3. Results and discussion.....	92
III.3.1. Process optimisation of the production of the maple bark extracts .....	92
III.3.2. Application potential of the maple extracts.....	97
III.4. Conclusions .....	100
III.5. Analyses complémentaires .....	101
III.5.1. Méthodes de chromatographie liquide.....	101
III.5.2. Profils chromatographiques des deux essences .....	101
III.5.3. Effet des procédés sur le profil de l’érable rouge.....	102
<b>IV. Chapitre 4 – Étude des composés phénoliques antioxydants majoritaires de l’extrait à l’eau chaude d’écorce d’érable rouge par méthodes de DPPH en pré-colonne.....</b>	<b>105</b>
IV.1. Introduction.....	107
IV.2. Material and methods.....	109
IV.2.1. Chemicals.....	109
IV.2.2. Production of red maple bark extract (RMBE) .....	109
IV.2.3. LC–HRMS analysis .....	110

IV.2.4. Pre-column DPPH spiking analyses .....	110
IV.2.5. Pre-column DPPH–HPLC analysis for antioxidant efficiency (DPPH–HPLC/AE) .....	111
IV.2.6. Data processing.....	112
IV.3. Results and discussion .....	112
IV.3.1. Identification of major phenolic compounds.....	112
IV.3.2. DPPH spiking analysis of RMBE.....	114
IV.3.3. Significance of the DPPH spiking method .....	115
IV.3.4. DPPH–HPLC/AE experiments.....	117
IV.3.5. DPPH spiking applied to pure compounds .....	121
IV.3.6. Exploration of the mixture effect.....	122
IV.4. Conclusions.....	124
<b>V. Chapitre 5 – Exploration d’un procédé basé sur l’ultrafiltration pour le fractionnement d’extraits à l’eau chaude.....</b>	<b>125</b>
V.1. Matériel et méthodes .....	126
V.1.1. Matériel.....	126
V.1.2. Test d’hémolyse .....	126
V.1.3. SDS-PAGE.....	127
V.1.4. Production de fractions par ultrafiltration.....	127
V.1.5. Colorimétrie et analyse élémentaire.....	128
V.1.6. Analyses chromatographiques et spectroscopiques.....	129
V.2. Résultats et discussion.....	131
V.2.1. Saponosides et protéines.....	131
V.2.2. Conditions opératoires de l’ultrafiltration .....	132
V.2.3. Caractérisation des fractions obtenues .....	133
V.2.4. Exploration des tannins .....	137
V.3. Conclusions et perspectives.....	140
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>141</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>143</b>

<b>Tableau I.1</b> : Teneurs en phénols totaux des extraits d'érables à sucre et rouge. ....	<b>30</b>
<b>Tableau I.2</b> : Exemples de phases mobiles associées à une phase stationnaire silice pour la migration de composés spécifiques des érables et réactifs de révélation. ....	<b>35</b>
<b>Tableau I.3</b> : Exemples de méthodes corrélatives de RMN 2D usuelles. ....	<b>45</b>
<b>Tableau I.4</b> : Principaux tests chimiques pour la mise en évidence d'extractibles antioxydants. ....	<b>47</b>
<b>Tableau I.5</b> : Exemples de conditions d'extractions des érables et composés associés. ....	<b>52</b>
<b>Tableau I.6</b> : Matériaux constituant les membranes des différents procédés de filtration. ....	<b>61</b>
<b>Tableau I.7</b> : Modules pour membranes dans l'industrie. ....	<b>63</b>
<b>Tableau I.8</b> : Différentes variantes du procédé de lyophilisation par pulvérisation. ....	<b>68</b>
<b>Table II.1</b> : Ranges and estimations (means) of the maximum extraction yield, total phenolic content, antioxidant capacity for sugar maple, <i>Acer saccharum</i> (AS) and red maple, <i>Acer rubrum</i> (AR) bark extracts .....	<b>76</b>
<b>Table II.2</b> : Correlations between extraction yield, total phenolic content, antioxidant capacity for sugar maple (AS) and red maple (AR) bark extracts .....	<b>77</b>
<b>Table II.3</b> : Sugar maple (AS) and red maple (AR) bark extracts selected for principal component analysis .....	<b>79</b>
<b>Table III.1</b> : Chemical composition, antioxidant capacity and recovery of red maple bark extract (RMBE), and energy consumption of the processes, depending on the different combinations of unit operations performed .....	<b>95</b>
<b>Table III.2</b> : Chemical composition, antioxidant capacity and recovery of sugar maple bark extract (SMBE), and energy consumption of the processes, depending on the different combinations of unit operations performed .....	<b>96</b>
<b>Table III.3</b> : Antioxidant potential (ORAC value and EC50 towards DPPH• value) of optimised sugar and red maple bark extracts compared to standard food additives .....	<b>99</b>
<b>Table IV.1</b> : LC–HRMS determination of phenolic compounds in red maple bark extract and associated peak area (PA) reduction after DPPH spiking .....	<b>113</b>
<b>Table IV.2</b> : Proportion in red maple bark extract and DPPH scavenging values for selected compounds ginnalin A, ginnalin C and gallic acid (ascorbic acid used as control) .....	<b>116</b>
<b>Tableau V.1</b> : Composition chimique et capacité antioxydante des fractions des deux essences d'érable (AR, AS) obtenues par ultrafiltration opérée au laboratoire pilote. ....	<b>133</b>
<b>Tableau V.2</b> : Aires des pics d'HPLC correspondant aux 12 composés majoritaires (1–12) du profil à 280 nm des fractions AR F1, AR F2 et AR F3. ....	<b>135</b>
<b>Tableau V.3</b> : Résidus de pyrolyse identifiés et caractérisés par GC–MS par déréplication pour les fractions AR F1 et AS F1 .....	<b>139</b>

<b>Figure I.1</b> : Distribution des espèces du genre <i>Acer</i> . .....	3
<b>Figure I.2</b> : Photographies d'un plan transversal de bois d' <i>Acer saccharum</i> 100× (gauche) et d'un plan transversal de bois d'érable dur (droite). .....	4
<b>Figure I.3</b> : Croquis d'écorce, fruits, feuilles et bourgeons d' <i>Acer saccharum</i> . .....	4
<b>Figure I.4</b> : Photographie d'un plan transversal de bois d' <i>Acer rubrum</i> 100× (gauche). Photographie d'un plan transversal de bois d'érable tendre (droite). .....	5
<b>Figure I.5</b> : Croquis d'écorce, fruits, feuilles et bourgeons d' <i>Acer rubrum</i> . .....	5
<b>Figure I.6</b> : Représentation détaillée de l'anatomie du tronc : moelle, bois (1 cerne annuel représenté) et écorce. ....	6
<b>Figure I.7</b> : Structure moléculaire de la cellulose (seulement 3 unités représentées). .....	7
<b>Figure I.8</b> : Exemple typique de structure d'hémicellulose (seulement quelques unités représentées). .....	8
<b>Figure I.9</b> : Structure générale de la lignine (seulement quelques unités phénylpropanes représentées). ....	8
<b>Figure I.10</b> : Relations biogénétiques et voies de biosynthèse des principales classes de métabolites chez les végétaux. ....	10
<b>Figure I.11</b> : Structure de la coenzyme A, catalyseur de multiples réactions métaboliques. ....	11
<b>Figure I.12</b> : Structure des monosaccharides les plus fréquents chez les végétaux sous la forme de leur anomère usuel. ....	13
<b>Figure I.13</b> : Structure du sucrose, disaccharide des écorces d' <i>Acer rubrum</i> et <i>Acer saccharum</i> . ....	13
<b>Figure I.14</b> : Structure de l'inuline, un polysaccharide du sirop d'érable. ....	14
<b>Figure I.15</b> : Composés phénoliques issus de la voie de l'acide shikimique. ....	15
<b>Figure I.16</b> : Voie mixte shikimates/acétates à l'origine des flavonoïdes et stilbènes. ....	16
<b>Figure I.17</b> : Acide chlorogénique, hydroxycinnamique de l'érable à sucre. ....	17
<b>Figure I.18</b> : Saccharumoside C, glycoside hydroxybenzoïque spécifique de l'écorce d'érable à sucre. ....	18
<b>Figure I.19</b> : Ginnaline A ou « accertannin », gallotannin spécifique du genre <i>Acer</i> . ....	19
<b>Figure I.20</b> : Acide ellagique, produit de l'hydrolyse des ellagitannins. ....	20
<b>Figure I.21</b> : Vanilloside, glucoside phénolique de l'écorce d'érable à sucre. ....	20
<b>Figure I.22</b> : Cléomiscosine D, coumarino-lignane de l'érable à sucre. ....	20
<b>Figure I.23</b> : Saccharumoside A, néolignane spécifique de l'écorce d'érable à sucre. ....	21
<b>Figure I.24</b> : Rubrumoside A, oxynéolignane spécifique de l'écorce d'érable rouge. ....	21
<b>Figure I.25</b> : Quercitrine, flavanol présent chez l'érable à sucre et l'érable rouge. ....	22
<b>Figure I.26</b> : Procyanidine A2, tannin condensé de l'érable rouge. ....	23
<b>Figure I.27</b> : Chrysanthémine, anthocyane des bourgeons de l'érable rouge. ....	24
<b>Figure I.28</b> : (E)-3,3'-diméthoxy-4,4'-dihydroxystilbène, stilbène du sirop d'érable. ....	25
<b>Figure I.29</b> : Structure de base des peptides. ....	25
<b>Figure I.30</b> : Daucostérol, saponoside monodesmoside stéroïdique de l'érable à sucre. ....	26

<b>Figure I.31</b> : Schéma récapitulatif de la formation des précurseurs des différentes classes de terpènes et des stéroïdes (e.g. $\beta$ -sitostérol).....	<b>27</b>
<b>Figure I.32</b> : Gramine, alcaloïde de l'érable rouge.....	<b>28</b>
<b>Figure I.33</b> : Profil protéique mensuel de l'écorce d'érable à sucre obtenu par SDS-PAGE.....	<b>32</b>
<b>Figure I.34</b> : Schéma représentatif de la technique de chromatographie sur couche mince.....	<b>34</b>
<b>Figure I.35</b> : Principe de l'exclusion stérique. Courbe de calibration pour déterminer la masse moléculaire (M) des composés en fonction de leur rétention.....	<b>38</b>
<b>Figure I.36</b> : Principe de centrifugation utilisé pour accélérer la séparation en chromatographie à contre-courant.....	<b>40</b>
<b>Figure I.37</b> : Spectres et maxima d'absorption UV/Vis caractéristiques de (gauche à droite) l'acide ellagique, des acides-phénols, des flavonoïdes et des anthocyanes.....	<b>42</b>
<b>Figure I.38</b> : Principe d'un appareillage standard de spectrométrie de masse.....	<b>43</b>
<b>Figure I.39</b> : Représentation schématique d'une particule d'écorce dans son solvant d'extraction.....	<b>51</b>
<b>Figure I.40</b> : Représentation schématique d'un appareillage d'extraction par fluide pressurisé.....	<b>53</b>
<b>Figure I.41</b> : Représentation schématique d'un appareillage d'évaporation sous vide simple ou rotavap.....	<b>55</b>
<b>Figure I.42</b> : Schéma typique de partition d'un extrait aqueux ou alcoolique.....	<b>56</b>
<b>Figure I.43</b> : Représentation schématique d'une extraction en phase solide.....	<b>57</b>
<b>Figure I.44</b> : Échelles de pores des différents types de filtration pour filtrer des composés et organismes spécifiques.....	<b>59</b>
<b>Figure I.45</b> : Principe de l'osmose inverse appliqué à un extrait aqueux.....	<b>60</b>
<b>Figure I.46</b> : Représentation schématique des différents types et structures de membranes.....	<b>62</b>
<b>Figure I.47</b> : Représentation schématique d'un appareillage de séchage par atomisation.....	<b>65</b>
<b>Figure I.48</b> : Diagramme de phases de l'eau présentant les différentes étapes lors du séchage par lyophilisation.....	<b>66</b>
<b>Figure II.1</b> : Interaction $R \times D$ between factors ratio (R) and duration (D) for the variable extraction yield, <i>Acer rubrum</i> (AR) bark extracts.....	<b>77</b>
<b>Figure II.2</b> : Energy consumption based on the variable EC for each extraction condition (PS, T, R, D) ....	<b>78</b>
<b>Figure II.3</b> : Interaction $R \times PS$ between factors ratio (R) and particle size (PS) for the variable extraction yield, <i>Acer saccharum</i> (AS) bark extracts.....	<b>78</b>
<b>Figure II.4</b> : Scatter plots of first principal component (PC1) versus second principal component (PC2) for selected <i>Acer rubrum</i> (AR) bark extracts.....	<b>80</b>
<b>Figure II.5</b> : Scatter plots of second principal component (PC1) versus third principal component (PC2) for selected <i>Acer saccharum</i> (AS) bark extracts.....	<b>81</b>
<b>Figure III.1</b> : Schematic diagram showing apparatuses and unit operations for red maple bark extract production processes.....	<b>87</b>
<b>Figure III.2</b> : Energy consumption calculated using the variable EC, associated to each unit operation of maple bark extract production processes.....	<b>93</b>
<b>Figure III.3</b> : Principal component analysis for red maple bark extract production processes.....	<b>94</b>

<b>Figure III.4</b> : Chromatogrammes des extraits de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre à 280 nm et 350 nm.....	<b>102</b>
<b>Figure III.5</b> : Chromatogrammes des extraits d'écorce d'érable rouge issus des différents traitements post-extractions réalisés en laboratoire pilote.....	<b>103</b>
<b>Figure III.6</b> : Analyse en composantes principales des profils HPLC à 280 nm des extraits d'écorce d'érable rouge produits au laboratoire pilote (AR EA, EL, OA, OL).....	<b>103</b>
<b>Figure IV.1</b> : Chromatograms of HPLC-DAD (280 nm) before reaction (A) and DPPH spiking (280 nm) after reaction (B) of red maple bark aqueous extract (0.5 mg/mL).....	<b>114</b>
<b>Figure IV.2</b> : Scatter plot of ginnalin A, ginnalin C and gallic acid peak area (PA) reduction percentages and the corresponding molar amounts reacted (MAR) in the extract versus the final concentration of red maple bark extract (mg/mL) following DPPH spiking .....	<b>117</b>
<b>Figure IV.3</b> : UV spectra of DPPH <sup>*</sup> and DPPH-H (a) and DPPH-HPLC/AE chromatograms (516 nm) in presence of ginnalin A at 0 µg/mL (b), 0.1 mg/mL (c), 0.175 mg/mL (d) .....	<b>118</b>
<b>Figure IV.4</b> : Scatter plot of the DPPH scavenging percentage versus MAI, the respective amounts of ginnalin A, ginnalin C, gallic acid and ascorbic acid injected (expressed as mol of compound/mol of DPPH <sup>*</sup> injected), after DPPH-HPLC/AE.....	<b>119</b>
<b>Figure IV.5</b> : Scatter plots of the amount of ginnalin A (a), ginnalin C (b), gallic acid (c) and ascorbic acid (d) reacted (MAR) versus MAI, the respective amounts injected (all expressed as mol of compound/mol of DPPH <sup>*</sup> injected), following DPPH spiking.....	<b>120</b>
<b>Figure V.1</b> : Résultats du test d'hémolyse sur gélose d'agar .....	<b>131</b>
<b>Figure V.2</b> : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des protéines des extraits .....	<b>131</b>
<b>Figure V.3</b> : Évolution du débit de perméat lors de l'ultrafiltration avec membrane de 30 kDa des extraits d'écorce d'érable (AR, AS).....	<b>132</b>
<b>Figure V.4</b> : Chromatogrammes des fractions de l'extrait aqueux d'écorce d'érable rouge produites par ultrafiltration opérée au laboratoire pilote .....	<b>134</b>
<b>Figure V.5</b> : Fractions issues d'ultrafiltrations observées en SEC à 280 nm.....	<b>136</b>
<b>Figure V.6</b> : Pyrogrammes obtenus après Py-GC-MS des fractions AR F1 et AS F1 .....	<b>138</b>

AAPH	<i>2,2'-azo-bis(2-amidinopropane hydrochloride)</i>
ABTS	<i>acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)</i>
ADN	<i>acide désoxyribonucléique</i>
ADP	<i>adénosine diphosphate</i>
ANOVA	<i>analyse de la variance</i>
AFBSFD	<i>atmospheric fluidized bed spray-freeze-drying</i>
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
APPI	<i>atmospheric pressure photo-ionisation</i>
AR	<i>Acer rubrum</i> L.
AS	<i>Acer saccharum</i> Marsh.
ASE	<i>accelerated solvent extraction</i>
ASFD	<i>atmospheric spray-freeze-drying</i>
ATP	<i>adénosine triphosphate</i>
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
CCC	<i>chromatographie liquide à contre-courant</i>
CCM	<i>chromatographie sur couche mince</i>
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CuPRAC	<i>cupric-reducing antioxidant capacity</i>
Da	<i>daltons</i>
DAD	<i>diode array detector</i>
DMAPP	<i>diméthylallyl-pyrophosphate</i>
DNS	<i>dinitrosalicylic acid</i>
DPPH*	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FD	<i>freeze-drying</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FID	<i>flame ionisation detector</i>
FPP	<i>farnésyl-pyrophosphate</i>
FRAP	<i>ferric-reducing antioxidant power</i>
FT-ICR	<i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>
GAP	<i>phosphate de glycéraldéhyde</i>
GAE	<i>gallic acid equivalent</i>
GC	<i>gas chromatography</i>
GFC	<i>gel filtration chromatography</i>
GFPP	<i>géranyl-farnésyl-pyrophosphate</i>
GGPP	<i>géranyl-géranyl-pyrophosphate</i>
GPC	<i>gel permeation chromatography</i>
GPP	<i>géranyl-pyrophosphate</i>
GRAS	<i>generally recognised as safe</i>
HAT	<i>H-atom transfer</i>
HHPE	<i>high hydrostatic pressure extraction</i>
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HILIC	<i>hydrophilic interaction chromatography</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSCCC	<i>high speed countercurrent</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
IEC	<i>ion-exchange chromatography</i>
INADEQUATE	<i>incredible natural-abundance double-quantum transfer experiment</i>
IPP	<i>isopentyl-pyrophosphate</i>
IR	<i>infrarouge</i>

IRMPD	<i>infrared multi-photon photodissociation</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
LSD	<i>least significant difference</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionisation</i>
MEP	<i>2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate</i>
MF	<i>microfiltration</i>
MPLC	<i>medium pressure chromatography</i>
M <sub>w</sub>	<i>masse moléculaire</i>
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate</i>
Nc	<i>néocuproïne</i>
NF	<i>nanofiltration</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
NP	<i>normal phase</i>
OI	<i>osmose inverse</i>
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
PCET	<i>proton-coupled electron transfer</i>
PEG/PEO	<i>polyéthylène glycol/poly(ethylene oxide)</i>
PEM	<i>polymère à empreinte moléculaire</i>
PFE	<i>pressurized fluid extraction</i>
PTIO	<i>2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide</i>
RI	<i>refractive index</i>
RMN	<i>résonance magnétique nucléaire</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ROO <sup>•</sup>	<i>radical peroxyde</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	<i>reverse phase</i>
SAFBSFD	<i>sub atmospheric fluidized bed spray-freeze-drying</i>
SASFD	<i>sub atmospheric spray-freeze-drying</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i>
SET	<i>single-electron transfer</i>
SFL	<i>spray freezing into liquid</i>
SFV	<i>spray freezing into vapour</i>
SFV/L	<i>spray freezing into vapour over liquid</i>
SID	<i>surface-induced dissociation</i>
SOMO	<i>singly occupied molecular orbital</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
SPLET	<i>sequential proton-loss electron transfer</i>
subsp.	<i>subspecies</i>
TCD	<i>thermal conductivity detector</i>
TE	<i>trolox equivalent</i>
TEAC	<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
THF	<i>tétrahydrofurane</i>
TLC	<i>thin-layer chromatography</i>
tma	<i>tonne métrique anhydre</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPTZ	<i>2,4,6-tripyridyl-s-triazine</i>
Trolox	<i>acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique</i>
UF	<i>ultrafiltration</i>
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UPE	<i>ultra-high-pressure extraction</i>
UV-Vis	<i>ultraviolet-visible</i>

*À ma grand-mère*

*« Même si tu n'aimes pas le lièvre, reconnais au moins qu'il court vite »*

Proverbe burkinabè

*« Real research is always a collective activity »*

Noam Chomsky

*« La nature est une bibliothèque, lisez-la au lieu de la brûler »*

Idriss Aberkane

En premier lieu, je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien pendant un peu plus de trois ans, permettant ainsi la finalisation de cette thèse.

Plus spécifiquement, je voudrais remercier chaleureusement ma directrice et mon co-directeur de thèse, les professeurs Tatjana Stevanovic et Yves Fortin. La chance qu'ils m'ont donnée en me proposant ce sujet de doctorat a permis au néophyte en chimie des extractibles et des produits naturels que j'étais, de découvrir une discipline riche et passionnante. Au-delà de la recherche, ces trois années ont été pour moi une expérience humaine extraordinaire et je vous en sais gré.

Tatjana, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces années de thèse. Je suis certain que le temps passé sous votre direction se révélera très formateur pour la suite de mon parcours.

Yves, pour avoir cherché la petite bête dès que c'était nécessaire dans le but de bonifier ce travail, je tiens à vous remercier. Votre professionnalisme et votre rigueur scientifique resteront un exemple pour moi.

Je suis également reconnaissant envers les professeurs Cristina Ratti et Paul Angers qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse. Merci beaucoup pour vos avis toujours éclairés lors de nos rencontres.

De plus, je souhaite remercier Mme Béatrice George, maître de conférence à l'Université de Lorraine, qui elle aussi a accepté la tâche d'évaluer ce travail. J'adresse également mes chaleureux remerciements au professeur Alain Cloutier qui a pris de son temps pour présider mon jury de thèse.

Je remercie en outre M. Clermont Levasseur, président de Levaco Inc. pour son implication dans le projet.

Ma sincère gratitude va à tous les employés de l'université qui m'ont aidé lors de ce doctorat.

En particulier, je remercie Mme Marthe Larouche, entre autres, pour sa sollicitude et sa bonne humeur contagieuse, et Mme Caroline Trahan qui a brillamment pris sa relève.

Je souhaiterais remercier spécialement Mme Guylaine Bélanger, patronne *ès* administration du Kruger. Merci Guylaine pour tous ces précieux conseils et ton implication dans mes petites tribulations administratives, toujours salvatrice.

Je remercie également le personnel technique des laboratoires et ateliers du CRM, en particulier M. Yves Bédard dont l'aide et la patience m'ont grandement apporté, ainsi que messieurs Daniel Bourgault, Luc Germain, David Lagueux, Jean Ouellet et Félix Pedneault pour leur disponibilité lors des travaux réalisés.

Merci également au personnel du LTA, Mme Mélanie Martineau et M. Pascal Lavoie pour leur support très apprécié.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Mme Diane Gagnon, super-héroïne de l'INAF dont l'expérience et la bienveillance m'ont toujours permis de trouver une place pour travailler en toute sérénité lors de mes escapades au Comtois.

De même, je suis très reconnaissant à M. Pierre Audet de nous avoir accordé, à Romaric et à moi, de son temps pour partager sa passion pour la chimie analytique, celle-ci a grandement influencé l'orientation donnée à ce travail.

Je voudrais remercier les anciens membres de l'équipe « extractibles » : Sarra et Alex, pour avoir supporté leur maître de stage débutant, Shyam, pour son implication très appréciée dans mes travaux, Pierre et Jean-Bosco, pour leur humour et leur vision du monde inspirante.

Je ne saurais conclure cette section sans remercier comme il se doit les membres éminents du *pimp office* : Nellie, Romaric et Sagar. Merci pour tous ces fous rires qui ont rendu ces trois ans inoubliables. Votre soutien, nos nombreuses discussions et les « fin de la monde » ont permis l'aboutissement de cette thèse, donc *barka woussogo*, धन्यवाद, *merci wesh* !

Merci à tout le reste de la gang pour avoir rendu ma vie à Québec si plaisante, spéciale dédicace à Max, Caro, Didine, Kek, Marine, Nico, Dadou, Marie, Cacou, MB, Bounette, Marie, Valentin, Mireille, Gab, Dom, Max, Sam, Thiébaud, Margaux, Sabita, José, Nassim, Ricardo, Erwan et Cédric. Merci également à celles et ceux, desquel(le)s un océan au moins me sépare, « je ne vous oublie pas, non, jamais ».

Pour m'avoir toujours soutenu malgré la distance qui nous séparait, je veux remercier mes parents et toute ma famille (Mamounet, Papounet, Mamie, Tata, Laure...). Avoir la chance de vous retrouver tous en pleine forme chaque année est la meilleure des motivations.

Enfin, pour m'avoir épaulé et supporté au quotidien tout le long de ces trois années, merci Léa pour tout (et plus encore), « t'es super ! »

## Avant-propos

Les travaux de recherche présentés dans le cadre de cette thèse ont été financés par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les entreprises Levaco, Inc. et Decacer, Inc. Ils ont été dirigés par la professeure titulaire Tatjana Stevanovic ing., Ph. D. et co-dirigés par le professeur associé Yves Fortin, ing., ing. f., Ph. D., dépendant tous deux du département des sciences du bois et de la forêt et doyen de la Faculté de Foresterie, Géographie et Géomatique de l'Université Laval et membres du Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR).

Si l'essentiel des expériences et manipulations a été réalisé au pavillon Gene-H.-Kruger dans les laboratoires du CRMR, certains tests ont pu être effectués dans différents laboratoires du pavillon Paul-Comtois (Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation) dont le Laboratoire de Technologie Alimentaire (LTA).

Dans cette thèse rédigée en langue française, une partie des résultats est présentée sous la forme de trois articles scientifiques (article 1, article 2 et article 3) rédigés en langue anglaise. Ceux-ci ont été intégrés en tant que chapitre 2, chapitre 3 et chapitre 4, respectivement. Pour compléter le corps de la thèse, le chapitre 1 est consacré à la revue de la littérature, tandis que le chapitre 5 présente des résultats non-soumis pour publication. Les trois articles sont présentés ci-après :

### *Article 1*

Geoffroy TR, Fortin Y, Stevanovic T (2017a) Hot-water extraction optimization of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark applying principal component analysis. *J. Wood Chem. Technol.* 37(4), 261–272. doi : 10.1080/02773813.2017.1279631

Publication soumise à la revue *Journal of Wood Chemistry and Technology* le 22/09/2016, révisée le 16/11/2016, acceptée le 14/12/2016 et publiée en ligne le 17/02/2017.

### *Article 2*

Geoffroy TR, Fortin Y, Stevanovic T (2017b) Process optimisation for pilot-scale production of maple bark extracts, natural sources of antioxidants, phenolics and carbohydrates. *Chem. Pap.* doi : 10.1007/s11696-017-0355-9

Publication soumise à la revue *Chemical Papers* le 03/10/2017, révisée le 17/11/2017, acceptée le 28/11/2017 et publiée en ligne le 12/12/2017.

### Article 3

Geoffroy TR, Meda NR, Stevanovic T (2017c) Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloyl derivatives from red maple bark extract. *Anal. Bioanal. Chem.* 409(22), 5228–5237. doi : 10.1007/s00216-017-0465-9

Publication soumise à la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry* le 12/04/2017, révisée le 05/06/2017, acceptée le 12/06/2017 et publiée en ligne le 07/07/2017.

Pour les articles 1 et 2, en tant que premier auteur j'ai planifié et réalisé les expériences, interprété les résultats et rédigé les manuscrits. Les travaux présentés dans l'article 3 ont été planifiés à l'initiative de Naamwin Romaric Meda, Pharm. D., MSc. Si j'ai effectué les expériences et rédigé l'article, l'interprétation des résultats a été faite conjointement avec le Dr Meda. Les trois articles ont subi une relecture finale par la Pr Stevanovic. Les articles 1 et 2 ont également été relus par le Pr Fortin, tandis qu'une révision finale de l'article 3 a été faite par le Dr Meda.

Les résultats produits dans le cadre de la thèse ont également été présentés en différentes occasions :

- Séminaire II, Cours SBO 8001, 22 novembre 2016, Québec, QC, Canada.  
Geoffroy TR, Fortin Y, Stevanovic T (oral) Valorisation de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre : Étude de l'extraction à l'eau chaude comme source de composés phénoliques antioxydants.
- Natural Products in Health, Agro-food and Cosmetics, Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists' Meeting, 28 juin – 1<sup>er</sup> juillet 2017, Lille, France.  
Geoffroy TR, Meda NR, Fortin Y, Stevanovic T (poster) Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloyl derivatives from red maple.
- Les Procédés Verts pour la Bioéconomie de Demain, Colloque Étudiant 2017, CRIBIQ, 25–26 septembre 2017, Québec, QC, Canada.  
Geoffroy TR, Fortin Y, Stevanovic T (oral) Optimisation d'un procédé pour la production d'extraits d'écorce d'érable : Sources de composés antioxydants, phénoliques et glucidiques.

## Introduction générale

L'écorce est un résidu abondant dans l'industrie forestière. Ce tissu externe au bois représente 9 à 15% du volume total d'une bille, expliquant qu'environ 17 millions de m<sup>3</sup> d'écorce sont générés annuellement à l'échelle du Canada (Feng *et al.* 2013). Au Québec, ce chiffre s'élevant à 4 Mt, est en grande partie dû aux secteurs du sciage (2,3 Mtma) et des pâtes et papiers (300 kg générés par tonne de pulpe produite) (Bajpai 2015 ; MERN 2002, 2015). Considérée comme un co-produit avec une valeur ajoutée relativement faible, l'écorce est le plus souvent brûlée pour la production d'énergie calorifique (Feng *et al.* 2013 ; Harkin et Rowe 1971). Toutefois, depuis plusieurs décennies, le concept de « bioraffinerie » gagne en importance. Basée sur une réutilisation maximale de la biomasse, la bioraffinerie propose des solutions alternatives aux procédures standards d'enfouissement et d'incinération (Browne *et al.* 2012 ; Chemat *et al.* 2012). L'écorce s'avère propice à des valorisations à haute valeur ajoutée basées, entre autres, sur ses extractibles. Ces composés chimiques pouvant atteindre 25% dans l'écorce, correspondent à des molécules qui, n'étant pas liées de manière covalente à la paroi cellulaire, peuvent être extraites à l'aide de solvants (Harkin et Rowe 1971 ; Stevanovic et Perrin 2009). Souvent bioactifs, ces composés représentent une manne pour les secteurs cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques. Devant le déclin des additifs et actifs de synthèse entraîné par la demande croissante des consommateurs en produits naturels, des extractibles aux propriétés biologiques reconnues constituent une alternative séduisante (*e.g.* huiles essentielles, resvératrol, Taxol®) (Chemat *et al.* 2012).

Pour investiguer et établir de telles propriétés et bioactivités, la première approche de la recherche consiste généralement à évaluer l'activité des composés extractibles par tests chimiques *in vitro*. Le criblage chimique permet alors de se concentrer sur des fractions ou composés purs d'intérêt (Meda *et al.* 2017a). De nombreuses considérations accompagnent toute démarche de valorisation ultérieure. Du point de vue biologique, des modèles *in vivo* sont nécessaires pour établir la non-toxicité des composés, ainsi que des effets biologiques significatifs (Sarker *et al.* 2005). En parallèle, l'approche phytochimique peut renseigner sur les identités et structures des extractibles à l'aide de techniques de séparation chromatographiques et de détection et caractérisation spectroscopiques. Enfin, les renseignements fournis permettent d'envisager les procédés les plus efficaces pour récupérer les biomolécules ciblées. Du conditionnement de l'écorce, aux techniques d'extraction, de séparation, de concentration et de séchage des composés, un soin particulier est requis pour maximiser la quantité des extractibles produits et surtout leur préservation. Ce dernier point est vital, des modifications de structure et une perte de l'activité étant à craindre chez ces composés souvent thermosensibles, photosensibles, voire prompts à s'oxyder dans l'air (Rostagno et Prado 2013 ; Sarker *et al.* 2005).

L'érable rouge (*Acer rubrum* L.) et l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) sont deux essences commerciales du Québec dont l'écorce et particulièrement ses extractibles ont récemment fait l'objet de plusieurs études (Bi *et al.* 2016 ; Ma *et al.* 2016 ; Royer *et al.* 2011 ; St-Pierre, F. *et al.* 2013 ; Yuan *et al.* 2011, 2012). Des activités antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antifongiques, anti-tumorales, anti-

inflammatoires, anti-diabète, anti-mélanogéniques et anti-glycation ont été mises en évidence, principalement dues à des extractibles phénoliques de l'écorce : les ginnalines et maplexines chez l'érable rouge et les saccharumosides chez l'érable à sucre (Bi *et al.* 2016). Ces molécules, le plus souvent extraites par solvants alcooliques sont également susceptibles d'être présentes dans des extraits aqueux d'après les comparaisons de tels extraits en termes de teneur en composés phénoliques et d'activité antioxydante (Royer *et al.* 2011). Outre ces composés phénoliques, l'eau chaude, solvant vert compatible avec les principes de bioraffinerie, semble apte à extraire d'autres substances d'intérêt (protéines, saccharides, flavonoïdes, tannins, saponosides...), ce qui laisserait envisager différentes voies de valorisation possibles.

L'extraction à l'eau chaude a donc constitué la base du travail présenté dans cette thèse. Le mandat principal du projet a consisté en l'étude de l'optimisation des procédés à même d'obtenir des extraits antioxydants, à partir d'écorce d'érables (*Acer rubrum*, *Acer saccharum*) fournis par des partenaires industriels (Levaco, Inc. et Decacer, Inc.). De l'extraction à échelle laboratoire à un procédé de production complet à échelle laboratoire pilote, l'efficacité et la faisabilité des opérations unitaires ont été évaluées dans le but d'obtenir des extraits secs de qualité préservée. Le contrôle de la qualité des extraits a donné lieu à des investigations supplémentaires concernant l'activité antioxydante des dérivés galloyl-glucitol de l'érable rouge. L'exploration d'autres composés, dont les protéines mais surtout les tannins, a été combinée à l'évaluation du potentiel de l'ultrafiltration pour séparer et concentrer les différents types d'extractibles présents chez les deux érables.

# I. Chapitre 1 – État de l’art

## I.1. Le genre *Acer*

### I.1.1. Classification

Le genre *Acer* qualifiant communément les érables se retrouve chez les *Aceraceae*, famille de plantes dicotylédones comprenant également les *Dipteronia*. La famille des *Aceraceae* se classe parmi l’ordre des *Sapindales* selon la classification classique. Toutefois, certains chercheurs lui préfèrent une classification phylogénique consistant à regrouper les *Aceraceae*, avec les *Sapindaceae*, autre famille du même ordre. Ces différentes possibilités traduisent la complexité de la taxonomie et chimiotaxonomie visant la caractérisation des relations naturelles entre organismes vivants. Chez les plantes une connaissance précise de ces relations est vitale en phytochimie et en pharmacognosie, deux sciences elles-mêmes à la base des disciplines de premier plan que sont la médecine, la pharmacie ou la science des aliments (Heinrich *et al.* 2012).

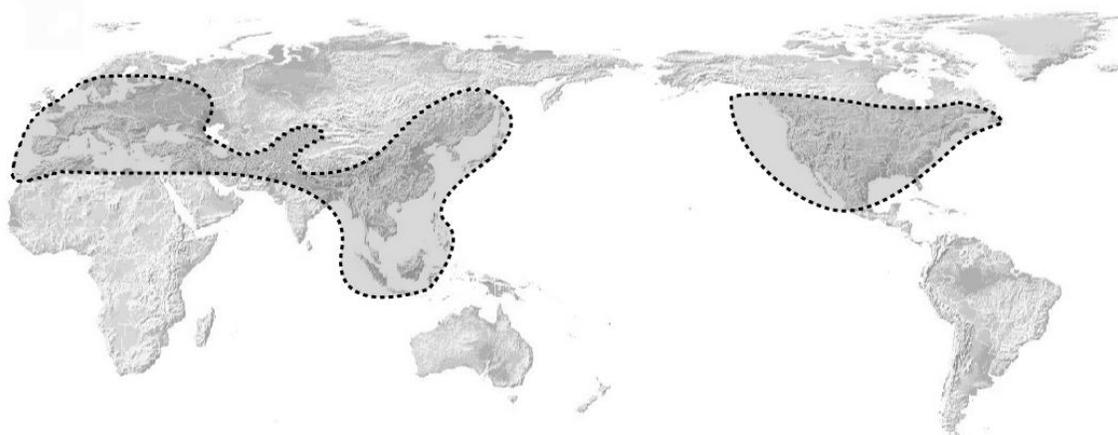


Figure I.1 : Distribution des espèces du genre *Acer*.  
Reproduction de radcyberzine.com (2002) libre de droits.

Les différentes espèces regroupées taxonomiquement dans le genre *Acer* se trouvent réparties principalement dans l’hémisphère Nord entre l’Amérique du Nord, l’Europe et l’Extrême-Orient (**Figure I.1**). Avec peu ou prou 129 espèces recensées, les érables ont depuis longtemps été employés en tant que produits naturels aux multiples vertus dans la médecine traditionnelle de nombreuses civilisations autour du monde (Bi *et al.* 2016). Le terme « produits naturels » est ici une appellation générale pouvant désigner l’organisme végétal à l’état naturel, une partie de l’organisme (feuilles, écorce...), un extrait de ces deux désignations ou bien un composé pur en étant issu (Sarker *et al.* 2005). Cette notion sera employée dans la revue selon ces différentes significations dépendamment du contexte, mais servira le plus souvent à désigner les « extractibles », « molécules extractibles » ou encore « composés extractibles ». À ce jour, un peu plus de 330 produits naturels ont été identifiés au sein de 34 espèces d’érables (sur les 129 recensées), incluant

*Acer saccharum* Marsh., l'érable à sucre (AS) et *Acer rubrum* L., l'érable rouge (AR), deux espèces natives de l'Est du Canada et des États-Unis (Bi *et al.* 2016).

### I.1.2. *Acer saccharum* Marsh.

Probablement le plus célèbre des érables par le statut remarquable de sa feuille, emblème du Canada, l'érable à sucre est avec l'érable noir (*Acer saccharum* subsp. *nigrum*) la principale source de sirop d'érable, dont le Québec demeure le premier producteur. Obtenu par concentration de la sève, traditionnellement par évaporation mais incluant une étape d'osmose inverse dans les exploitations actuelles, ce sirop est reconnu pour ses propriétés organoleptiques et antioxydantes. Son utilisation était largement répandue chez les peuples autochtones du Canada, et ce bien avant la colonisation européenne (Krochmal *et al.* 1969). De nos jours, l'érable à sucre, aussi appelé érable franc est également une essence de bois parmi les plus utilisés dans l'industrie forestière du Québec. Il est très apprécié commercialement, en particulier dans le domaine de la construction, pour son bois très dur (Royer *et al.* 2010). D'ailleurs, d'un point de vue anatomique, sa forte densité basale 0,597–0,633 g.cm<sup>-3</sup> (Alemdag 1981 ; Jessome 1977), en partie expliquée par des dimensions similaires des plus gros vaisseaux et des rayons ligneux, classe l'érable à sucre dans la catégorie des érables durs (*Figure I.2*).

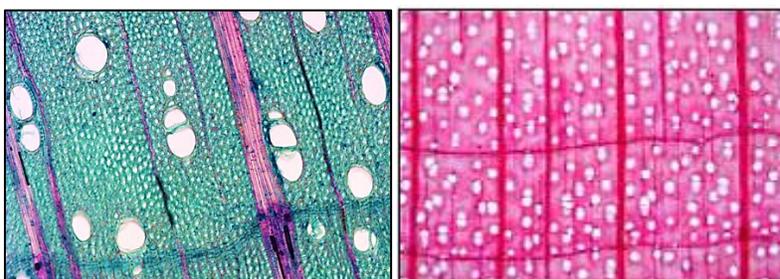


Figure I.2 : Photographies d'un plan transversal de bois d'*Acer saccharum* 100× (gauche) et d'un plan transversal de bois d'érable dur (droite).  
Reproduction (droite) issue du domaine public (Ross 2010).

Les autres particularités anatomiques de l'érable à sucre sont présentées en *Figure I.3*. La feuille à 5 lobes caractéristique de l'essence, les positions opposées des bourgeons relativement longs (en particulier le bourgeon terminal) et la forme des fruits permettent une identification généralement aisée (maple-trees.com 2000).

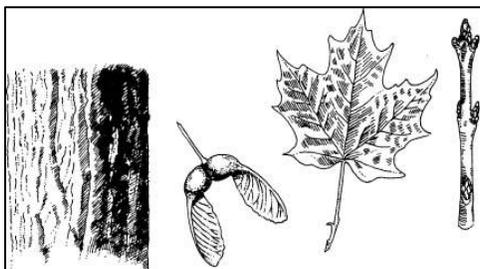


Figure I.3 : Croquis d'écorce, fruits, feuilles et bourgeons d'*Acer saccharum*.  
Reproduction de maple-trees.com (2000) avec autorisation de l'Ohio State University.

### I.1.3. *Acer rubrum* L.

L'érable rouge compte parmi les feuillus les plus représentés en Amérique du Nord. En cause, son adaptation à une large variété de sols et sa tolérance à l'ombre. Les individus vivent toutefois moins longtemps que les érables à sucre (rarement plus de 150 ans). Également employés pour la production de sirop à partir de sa sève, les arbres d'*Acer rubrum* en fournissent moins que ceux d'*Acer saccharum*. Toutefois les deux types de sève sont indifféremment utilisés pour la production de sirop d'érable (maple-trees.com 2000). L'érable rouge, communément appelé plaine au Québec se classe parmi les érables tendres dû à sa densité basale (0,516–0,561 g.cm<sup>-3</sup>) comparativement plus faible que celle de l'érable à sucre et des érables durs (Alemdag 1981 ; Jessome 1977). Son bois dont les plus gros vaisseaux sont significativement plus larges que les rayons ligneux (**Figure I.4**) est plus sujet aux déformations lors du séchage, il est donc peu employé pour la construction par rapport à l'érable à sucre (Royer *et al.* 2010).

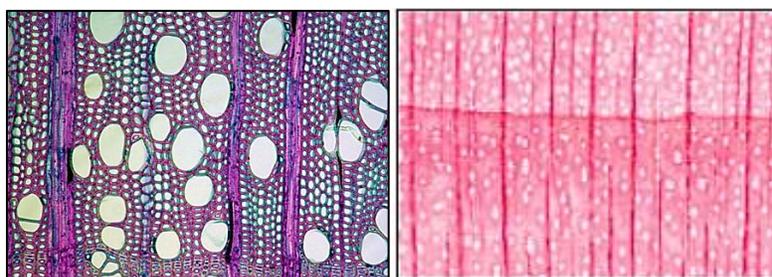


Figure I.4 : Photographie d'un plan transversal de bois d'*Acer rubrum* 100× (gauche). Photographie d'un plan transversal de bois d'érable tendre (droite).  
Reproduction (droite) issue du domaine public (Ross 2010).

Ce n'est pas la seule différence anatomique entre les deux essences. Si l'écorce est très similaire pour les deux espèces et rend l'identification difficile en hiver, les fruits, les feuilles et les bourgeons sont assez différents et de taille inférieure (**Figure I.5**).

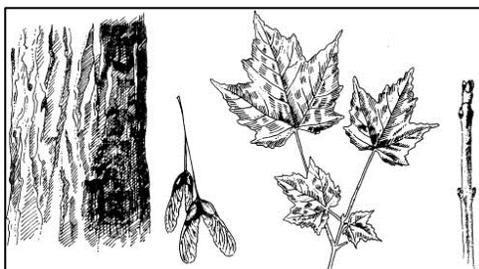


Figure I.5 : Croquis d'écorce, fruits, feuilles et bourgeons d'*Acer rubrum*.  
Reproduction de maple-trees.com (2000) avec autorisation de l'Ohio State University.

Chez les Premières Nations, outre l'emploi de son écorce interne comme produit alimentaire (pain de farine et d'écorce broyée), la médecine traditionnelle utilisait l'écorce d'érable rouge pour de nombreuses applications curatives. Parmi ces usages médicinaux variés principalement basés sur l'infusion de l'écorce, on peut citer, le traitement des plaies, des rhumatismes, des hémorroïdes, de la toux ou encore des irritations oculaires. Les applications médicinales traditionnelles à base d'autres essences du genre *Acer* recourent souvent à l'écorce infusée (*e.g.* *Acer negundo* L., *Acer platanoides* L., *Acer saccharum* Marsh.) (Bi *et al.*

2016 ; Royer *et al.* 2010). Cette partie de l'arbre semble donc très propice à la valorisation par l'extraction pour des secteurs économiques basant une partie de leur industrie sur les produits naturels (cosmétique, pharmaceutique, agro-alimentaire...).

## I.2. L'écorce et ses extractibles

### I.2.1. Anatomie de l'écorce

Le terme « écorce » réfère de manière générale aux tissus extérieurs recouvrant le tronc de l'arbre. Plus précisément, il désigne les tissus externes au cambium vasculaire. Cette fine membrane est aussi appelée méristème secondaire de par son rôle central dans la croissance « secondaire » ou croissance en diamètre. Le cambium produit vers l'extérieur le phloème (tissu de l'écorce) et vers l'intérieur le xylème (tissu du bois) (Cloutier *et al.* 2010). En pratique, l'écorce représente approximativement 9–15% du volume total d'une bille et 13–21% de sa masse anhydre (Feng *et al.* 2013).

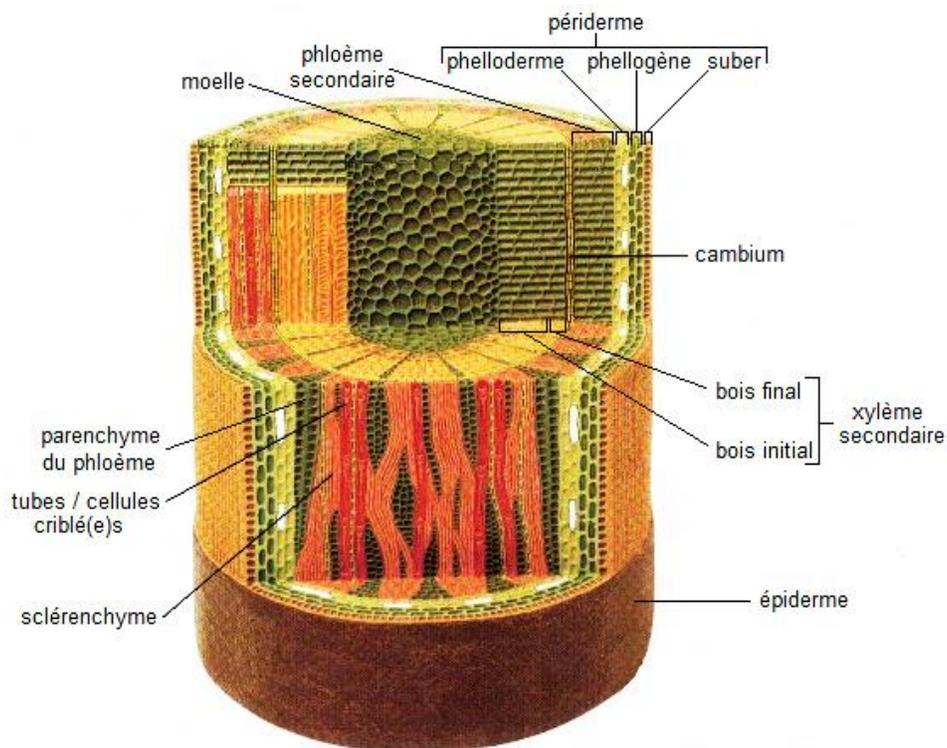


Figure I.6 : Représentation détaillée de l'anatomie du tronc : moelle, bois (1 cerne annuel représenté) et écorce. Adaptée de universe-review.ca (2002).

Les tissus de l'écorce peuvent être divisés en deux catégories : l'écorce interne essentiellement constituée par le phloème secondaire et l'écorce externe composée principalement du périderme secondaire, du cortex et de l'épiderme. À noter que l'écorce externe peut également contenir un phloème dit « affaissé » ou « inactif » couplé au périderme initial. Comme présenté sur le schéma de la **Figure I.6**, le périderme se compose de phellogène, un tissu de croissance (méristème) qui produit vers l'extérieur le suber ou liège et

vers l'intérieur le phelloderme ou cortex secondaire. Le cortex (non représenté ici) étant un tissu composé en majorité de parenchyme (cortical) et se situant entre le périderme et le phloème secondaire (Trockenbrodt 1990 ; Vaucher 1993).

Du point de vue cellulaire, le phloème est constitué, entre autres, de cellules de parenchyme qui fournissent et stockent les substances nutritives. Il contient également des rayons libériens (prolongement des rayons ligneux du xylème) qui jouent le rôle de tissus de réserve, étant composés de cellules de parenchyme. Sont aussi présentes dans le phloème, les cellules criblées (résineux) ou tubes criblés (feuillus) qui assurent le transport de la sève élaborée (sucres, acides aminés, tannins), mais aussi les cellules annexes qui permettent de réguler la formation des cellules criblées. Enfin, le phloème contient du sclérenchyme, tissu de soutien qui assure sa solidité, lui-même constitué de scléréides et de fibres de sclérenchyme (Jensen *et al.* 1963 ; Srivastava 1964).

Dans l'écorce externe, si le cortex et le phelloderme contiennent presque exclusivement du parenchyme, le suber (ou phellème) quant à lui possède 3 types de cellules subéreuses : les cellules subéreuses à phlobaphènes (substances phénoliques proches des tannins, stockées pour repousser les herbivores), les cellules subéreuses pierreuses à parois épaisses qui imperméabilisent l'écorce et les cellules subéreuses lacuneuses à parois minces qui permettent le détachement, sous forme d'écailles, du rhytidome (Trockenbrodt 1990).

### I.2.2. Composition chimique de l'écorce

L'écorce, comme les autres types de biomasse lignocellulosique est une matière organique composée donc en grande majorité de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, et dans une bien moindre mesure d'autres hétéroatomes (N, S...) et de composés inorganiques. Cette composition se traduit par des types de structures récurrentes :

- La cellulose qui se base sur une chaîne polymère linéaire constituée de glucose comme unité monomérique,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  telle que représentée partiellement en **Figure I.7**. Les interactions physico-chimiques entre les groupements hydroxyles d'une ou plusieurs molécules de cellulose confèrent à l'écorce sa rigidité. Ces interactions sous forme de liaisons hydrogènes sont également à l'origine de l'insolubilité dans l'eau et la plupart des solvants organiques de ce polymère *a priori* relativement polaire (Castro-Montoya et Jiménez-Gutiérrez 2012 ; Stevanovic et Perrin 2009).

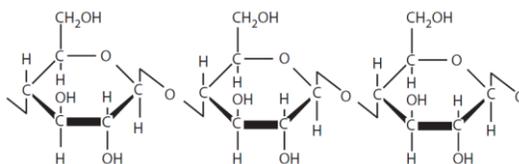


Figure I.7 : Structure moléculaire de la cellulose (seulement 3 unités représentées).  
Reproduction de Castro-Montoya et Jiménez-Gutiérrez (2012) avec autorisation de Taylor and Francis.

- Les hémicelluloses sont également des polysaccharides constituant la paroi cellulaire de l'écorce, mais contrairement à la cellulose plutôt cristalline et de haut degré de polymérisation, celles-ci sont des polymères amorphes de plus faibles masses moléculaires. Les hémicelluloses étant hydrosolubles, celles-ci seront également détaillées dans la partie I.3.2.2.1.2. traitant des oligo/polysaccharides extractibles de l'écorce. Leur structure générale (**Figure I.8**) se compose d'un réseau aléatoire très ramifié de dérivés de pentoses et d'hexoses, incluant principalement du xylose et le plus souvent du glucose, mannose, galactose, arabinose et leur formes uroniques et désoxy-aldoles. (Otieno et Ahring 2012 ; Stevanovic et Perrin 2009).

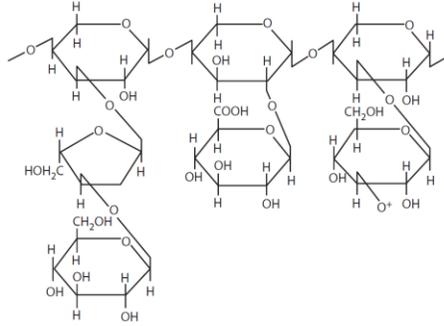


Figure I.8 : Exemple typique de structure d'hémicellulose (seulement quelques unités représentées).  
Reproduction de Castro-Montoya et Jiménez-Gutiérrez (2012) avec autorisation de Taylor and Francis.

- La lignine possède une structure tridimensionnelle plus complexe basée sur des polymères phénoliques constitués d'unités phénylpropanes (**Figure I.9**). Elle joue un rôle de protection pour la cellulose et les hémicelluloses en tirant parti de sa structure amorphe pour lier ces dernières à la paroi cellulaire (Castro-Montoya et Jiménez-Gutiérrez 2012).

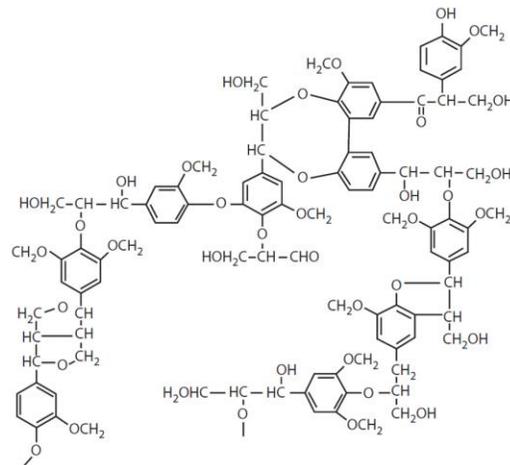


Figure I.9 : Structure générale de la lignine (seulement quelques unités phénylpropanes représentées).  
Reproduction de Castro-Montoya et Jiménez-Gutiérrez (2012) avec autorisation de Taylor and Francis.

Les proportions de ces trois constituants majoritaires peuvent varier plus ou moins largement entre espèces et selon l'appartenance à l'ensemble des feuillus ou des résineux (conifères). Ainsi, l'écorce des feuillus possède entre 40 et 55% de lignine, et 30 à 48% de polysaccharides (cellulose et hémicelluloses).

Ces chiffres sont proches pour les résineux avec 40–50% de lignine, et 32–45% de polysaccharides. À titre comparatif, le bois contient en moyenne, approximativement deux fois moins de lignine, pour deux fois plus de polysaccharides (Harkin et Rowe 1971).

À noter également la présence d'extractibles dans l'écorce, 2–25% chez les feuillus et 5–10% pour les résineux. Les extractibles sont deux fois plus abondants dans l'écorce que dans le bois (Harkin et Rowe 1971). Si la quantité d'extractibles dans l'écorce est variable d'une essence à l'autre, elle l'est également en fonction des saisons. Ainsi, une quantité maximale est généralement atteinte durant l'hiver, saison dite de la dormance, pendant laquelle il est conseillé de récolter l'écorce (Krochmal *et al.* 1969). Les extractibles sont généralement définis comme des substances non-liées à la paroi cellulaire, des molécules « libres » plus aisément extraites de la biomasse par l'eau ou les solvants organiques (Stevanovic et Perrin 2009). Les extractibles de l'écorce, originalement issus de la sève élaborée, se concentrent principalement dans les zones cellulaires non-vivantes de l'écorce externe, bien qu'étant présents dans les autres tissus. En particulier, dans le suber riche en subérine (cire) ou encore en tannins. Se retrouvent donc dans l'écorce des métabolites primaires, par exemple, des cires (esters d'acides gras ou d'alcool possédant une longue chaîne aliphatique) et des sucres libres (en particulier glucose et fructose). À noter également la présence de métabolites secondaires tels que des terpènes et des composés phénoliques, comme des flavonoïdes ou encore des tannins hydrolysables ou condensés (Crozier *et al.* 2006 ; Harkin et Rowe 1971 ; Jensen *et al.* 1963).

La diversité de ces composés au sein de l'écorce et leur fort potentiel d'application nous a amené à détailler plus avant la chimie des extractibles. Cette opération a été réalisée en lien avec les composés déjà isolés ou caractérisés au sein des deux essences d'érable étudiées, *Acer saccharum* Marsh. et *Acer rubrum* L.

### **I.2.3. Les extractibles potentiels de l'écorce**

Dans la suite de la revue de littérature, le parti a été pris de présenter les métabolites primaires et secondaires des végétaux pouvant être extraits de l'écorce d'érable. La classification est proposée en fonction de l'affinité de ces métabolites avec l'eau (solvant choisi pour cette étude) et des voies de biosynthèse qui leur sont associées.

#### **I.2.3.1. Voies de biosynthèse**

Généralement impliqués dans des mécanismes communs à tous les organismes vivants, les métabolites primaires détiennent un rôle prépondérant dans la photosynthèse, la respiration cellulaire, la croissance et le développement physiologique des végétaux. Les exemples les plus communs en sont les protéines, les huiles, les acides gras, les acides nucléiques ou les glucides (Khemani *et al.* 2012). Il existe aussi des métabolites secondaires qui ne participent pas à proprement dit au métabolisme des plantes. Ils sont généralement formés à partir des métabolites primaires, par des réactions chimiques dues à l'adaptation des végétaux soumis à des conditions environnementales particulières. Malgré la grande diversité de structures des métabolites secondaires, une classification en trois grands types est habituellement privilégiée : les terpénoïdes et stéroïdes dérivant de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), les alcaloïdes, composés azotés issus

des acides aminés, et enfin les composés phénoliques, particulièrement détaillés dans la suite de cette revue du fait de leur omniprésence dans l'écorce des végétaux (Croteau *et al.* 2000 ; Crozier *et al.* 2006).

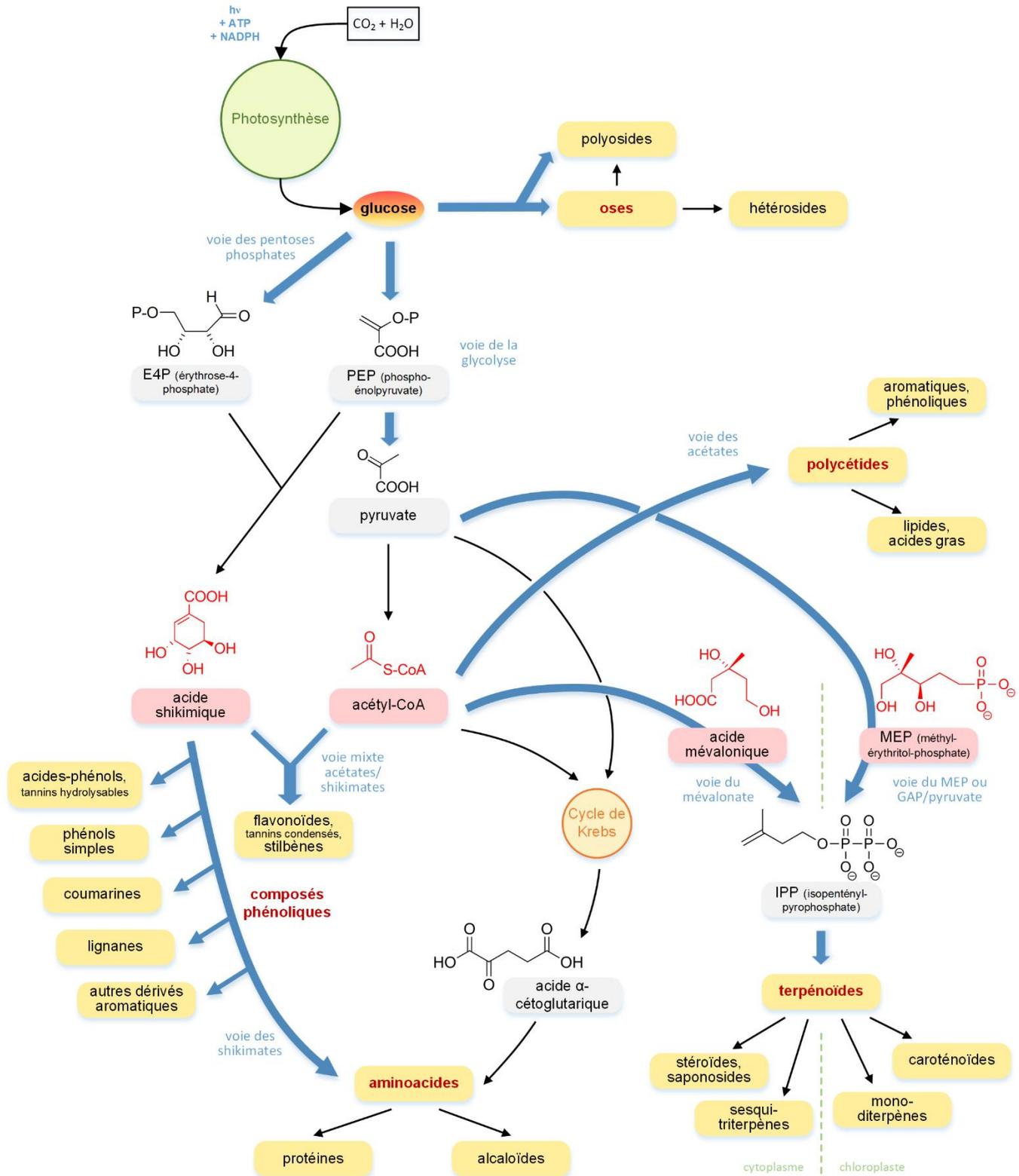
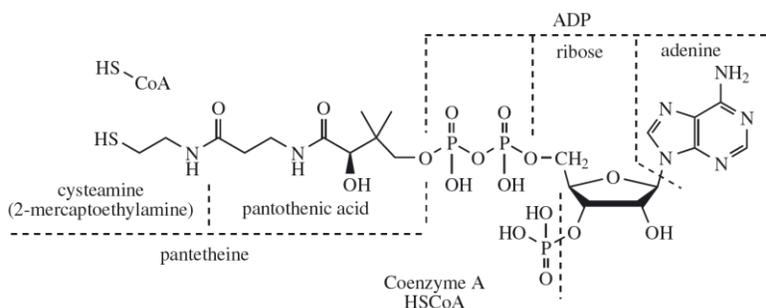


Figure I.10 : Relations biogénétiques et voies de biosynthèse des principales classes de métabolites chez les végétaux. Adaptation libre de droits (Vercauteren 2011).

L'ensemble des voies impliquées dans la biosynthèse des métabolites primaires et secondaires est résumé en **Figure I.10**. La photosynthèse constitue le point de départ du métabolisme. Brièvement, au sein des plantes, le tissu cellulaire des feuilles (ou aiguilles) contient des chloroplastes, organites où siège la réaction de photosynthèse. L'énergie lumineuse est accumulée durant la phase lumineuse (présence de lumière) sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), deux nucléotides impliqués dans la plupart des réactions métaboliques. Lors de la phase sombre (présence ou absence de lumière), ces nucléotides sont utilisés pour réduire le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) atmosphérique en présence d'eau et ainsi produire du glucose (Cloutier *et al.* 2010).

Les sucres simples (oses ou monosaccharides), dérivés du glucose issu de la photosynthèse sont impliqués dans une voie consistant en de nombreuses et complexes réactions enzymatiques. Pour produire les différentes structures plus détaillées dans la partie I.3.2.2.1.1., des nucléosides diphosphates sont généralement impliqués dans des réactions de transfert intramoléculaire, d'épimérisation ou encore d'oxydoréduction (Dewick 2002). Les oligo- et polysaccharides sont obtenus à partir d'oses simples greffés à un nucléoside diphosphate (nucléotide-ose). Ainsi activé, il devient possible pour le groupe électrophile (nucléotide) d'être remplacé par substitution nucléophile (S<sub>N</sub>2) par une autre molécule d'ose ou une chaîne osidique plus longue. La répétition selon différentes combinaisons de ces réactions souvent catalysées par des enzymes (ex : sucrose phosphate synthase et sucrose phosphatases impliquées dans la synthèse du sucrose) permet de produire un vaste panel d'oligo/polysaccharides (Bruneton 2009 ; Dewick 2002).



*Figure I.11 : Structure de la coenzyme A, catalyseur de multiples réactions métaboliques. Reproduction de Dewick (2002) avec autorisation de Wiley.*

Le glucose est également à la base des autres voies métaboliques (**Figure I.10**). La voie des pentoses-phosphates permet de biosynthétiser un tétrose, le E4P (érythrose-4-phosphate) à partir du glucose tandis que la voie de la glycolyse conduit à un intermédiaire PEP (phosphoénolpyruvate). Ces deux composés sont à la base de la voie de l'acide shikimique ou voie des shikimates fournissant la plupart des composés phénoliques et ultimement les aminoacides dont dérivent les protéines et les alcaloïdes. Ces composés azotés sont également biosynthétisables à partir de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique. Cet intermédiaire est impliqué sous forme de  $\alpha$ -cétoglutarate dans le cycle de Krebs (respiration cellulaire) au même titre que le pyruvate (issu du PEP par voie de la glycolyse) et que l'acétyl-CoA, lui-même issu du pyruvate. L'acétyl-CoA, composé activé et thioester couplant acide acétique et coenzyme A (**Figure I.11**) est à la base de la voie des acétates ou polyacétates qui, par condensations de Claisen successives forme les polycétides. Une réduction complète des groupements cétones des polycétides est à l'origine des chaînes alkyles linéaires des acides gras et lipides

en général. Sans réduction de ces groupements, il est possible par condensation de Claisen ou par aldolisation/déshydratation de produire des noyaux aromatiques (aromagénèse) à la base de composés phénoliques variés. Sur un principe similaire, l'aromagénèse peut se produire en mixant voie des acétates et des shikimates pour accéder à des composés phénoliques particuliers de type flavonoïdes et stilbènes. À partir d'acétyl-CoA, il est également possible de biosynthétiser l'acide mévalonique, précurseur de la voie du mévalonate produisant l'IPP (isopentényl-pyrophosphate) à l'origine des terpénoïdes et stéroïdes. À noter que l'IPP peut en outre être produit à partir de pyruvate par voie du MEP (2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate) aussi appelée voie GAP (phosphate de glycéraldéhyde)/pyruvate, celle-ci sera plus explicitée en I.2.3.3.1. (Croteau *et al.* 2000 ; Dewick 2002 ; Strack 1997 ; Vercauteren 2011).

D'autres exemples de biogénèses par voies mixtes existent mais sont généralement spécifiques de certaines espèces et ne seront donc pas détaillées ici. On peut tout de même citer à titre d'exemples les voies de deux métabolites d'intérêt : la voie mixte de l'acide shikimique impliquant l'acide mévalonique pour produire des dérivés d'alizarine (anthraquinones colorées), ainsi que la biogénèse des dérivés cannabinoïdes issus de la voie des acétates (formation de la chaîne alkyle, aromagénèse) et du MEP (GPP, géranyl-pyrophosphate pour former le squelette monoterpénique) (Bruneton 2009 ; Dewick 2002 ; Vercauteren 2011).

### **I.2.3.2. Les extractibles hydrosolubles**

Certains extractibles contenus dans l'écorce sont susceptibles d'être extraits par des solvants polaires tels que l'eau. Étant notre solvant d'étude, nous nous intéressons donc dans cette partie à ces composés qualifiés d'« hydrosolubles ».

#### **I.2.3.2.1. Les saccharides**

Les saccharides, glucides, sucres ou encore hydrates de carbone sont des métabolites primaires universels à tous les organismes vivants. Chez les plantes, outre leur rôle de soutien structural et de réserve énergétique sous forme de polymères, ils constituent la base des autres métabolites étant les premiers composés formés suite à la photosynthèse (Bruneton 2009).

##### **I.2.3.2.1.1. Monosaccharides**

La nomenclature des oses (monosaccharides ou sucres simples) ne sera pas rappelée dans cette partie étant détaillée dans de nombreux ouvrages de référence (Bruneton 2009 ; Dewick 2002 ; Stevanovic et Perrin 2009).

Si les structures monosaccharides que l'on retrouve le plus souvent chez les végétaux sont des hexoses (*e.g.* glucose, galactose, fructose) ou des pentoses (*e.g.* arabinose, xylose), d'autres structures plus originales sont susceptibles d'être présentes (**Figure I.12**). Leur présence est causée par des réactions d'oxydation et de réduction. Parmi ces composés, on peut citer les désoxy-oses, oses dont manquent un ou plusieurs hydroxyles (éliminés par réduction), les acides uroniques pour lesquels l'alcool primaire (en C-6)

est oxydé en acide carboxylique et le plus souvent intégré à des structures polymères, ou encore les polyols où la fonction carbonyle de l'ose est réduite en alcool.

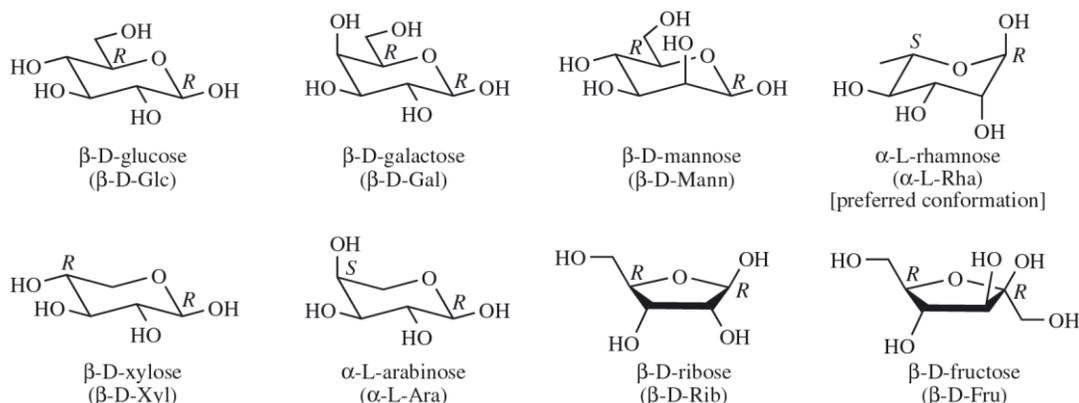


Figure 1.12 : Structure des monosaccharides les plus fréquents chez les végétaux sous la forme de leur anomère usuel. Reproduction de Dewick (2002) avec autorisation de Wiley.

Selon une étude récente menée dans notre laboratoire, les extraits aqueux d'écorce d'érable à sucre et d'érable rouge contiendraient respectivement 11% et 8% de sucres simples. Seuls deux types d'oses ont été détectés, deux hexoses, le fructose et le glucose et ce en quantités comparables (Bhatta 2018). À noter également que les composés phénoliques glycosylés isolés dans l'écorce d'érable rouge sont constitués de 1,5-anhydroglucitol, un désoxy-hexose dérivé d'un glucose dont la fonction alcool en C-1 a été éliminée par réduction (Yuan *et al.* 2012).

### I.2.3.2.1.2. Oligo- et polysaccharides

La condensation de deux à dix oses liées entre eux par une liaison osidique produit des oligosaccharides. Au-delà de dix molécules, on parle de polysaccharides. Parmi les disaccharides non réducteurs (liaison osidique entre fonctions réductrices au niveau des carbones anomériques des deux oses), on peut mentionner le sucrose ou saccharose (Figure 1.13), d'un glucose et d'un fructose. En tant que principale forme de transport et de réserve temporaire d'énergie des plantes, ce dissaccharide est particulièrement riche dans la sève et donc dans le sirop issu de l'érable à sucre et de l'érable rouge dans lequel il représente près de 97% des sucres totaux (St-Pierre, P. *et al.* 2014). Le sucrose est également présent au sein des extraits aqueux de l'écorce de ces érables, 11% de l'extrait pour l'érable à sucre et environ deux fois moins pour l'érable rouge (Bhatta 2018).

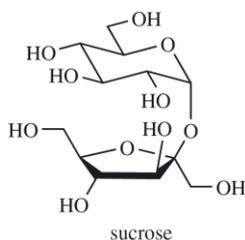


Figure 1.13 : Structure du sucrose, disaccharide des écorces d'*Acer rubrum* et *Acer saccharum*. Reproduction de Dewick (2002) avec autorisation de Wiley.

Le sirop d'érable demeure très pauvre en polysaccharides avec presque 0% des glucides totaux (St-Pierre, P. *et al.* 2014). Pourtant l'inuline (**Figure I.14**), polymère du fructose a été détectée dans le sirop d'érable. Ce composé est connu pour ces propriétés d'immunostimulation faisant de lui un prébiotique reconnu. D'autres polysaccharides ont également été rapportés dans le sirop tels que des arabinogalactanes et rhamnogalacturonanes, biopolymères issus de la paroi cellulaire primaires des érables (Sun *et al.* 2016). Dans ces conditions, des composés similaires sont susceptibles d'être extraits de l'écorce, surtout en considérant la forte concentration en sucres complexes (oligo/polysaccharides) extractibles de l'écorce : 25% pour l'extrait aqueux d'écorce d'érable à sucre et 19% pour celui d'érable rouge (Bhatta 2018). De plus, des travaux ont rapporté la possibilité d'extraire quantitativement à l'eau chaude d'autres polysaccharides non-cellulosiques : des dérivés d'hémicelluloses et de pectine de l'écorce démontrant également des propriétés d'immunostimulation (Le Normand *et al.* 2012, 2014). Comme les hémicelluloses, la pectine se classe parmi les fibres alimentaires hydrosolubles constituant la paroi cellulaire des végétaux. La structure de la pectine est assez variable. Elle contient généralement une longue chaîne linéaire d'acide galacturonique et de son ester de méthyle dans laquelle s'intercalent de faibles quantités de rhamnose et d'arabinose. Les hémicelluloses sont généralement considérées comme des polysaccharides pariétaux non celluloses et non pectiques. Comme la pectine, elles peuvent contenir des sous-unités arabinose mais également du xylose, du mannose, du galactose et de l'acide glucuronique, selon des structures très variées : polyxyloses, galactoglucomannanes, glucomannanes, arabinogalactanes, etc. (Bruneton 2009 ; Chen, H. 2014).

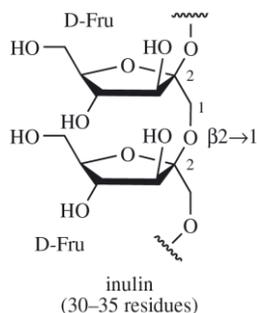


Figure I.14 : Structure de l'inuline, un polysaccharide du sirop d'érable.  
Reproduction de Dewick (2002) avec autorisation de Wiley.

### I.2.3.2.1.3. Hétérosides

Ces composés mixtes aussi appelés glycosides sont constitués d'un ou plusieurs sucres reliés par une liaison osidique à une molécule non osidique appelée génine ou aglycone. Un exemple typique de *N*-hétérosides (aglycones azotés) est la famille des nucléosides, les hétérosides végétaux étant en majorité des *O*-hétérosides (génines alcooliques ou phénoliques). La présence d'un ou plusieurs groupements saccharides au sein d'une telle molécule permet d'augmenter significativement la polarité d'un composé ainsi glycosylé et par là même son caractère hydrosoluble. Si les flavonoïdes restent relativement hydrosolubles sous forme de génines, les triterpènes et stéroïdes, génines liposolubles, deviennent plus hydrosolubles sous forme de saponosides, leurs *O*-hétérosides. Ces composés seront plus explicités dans la suite de cette revue. À noter

également, l'occurrence de C-hétérosides *e.g.* flavonoïdes dont l'ose peut être greffé par liaison C-C sur un carbone aromatique (Bruneton 2009).

Les hétérosides sont susceptibles de démontrer des bioactivités inhérentes aux différentes structures les composant. À titre d'exemple, il existe des oligo- voire polysaccharides arabinogalactanes estérifiés, greffés acide férulique ou *p*-coumarique (les groupement féruloyle et coumaryle étant généralement situés en C-6 au niveau du galactose et en C-2 sur l'arabinose). Ceux-ci sont spécifiques de certaines plantes céréalières et sucrières, et connus pour combiner activité antioxydante, effets probiotiques et inhibition de la glycation (Combo *et al.* 2011 ; Ishii 1997 ; Ou, J. et Sun 2014). D'autres hétérosides peuvent être néanmoins source de toxicité (malgré des effets anti-cancer), tels que les hétérosides cyanogènes (*O*-hétérosides) ou les glucosinolates (*S*-hétérosides) (Bruneton 2009).

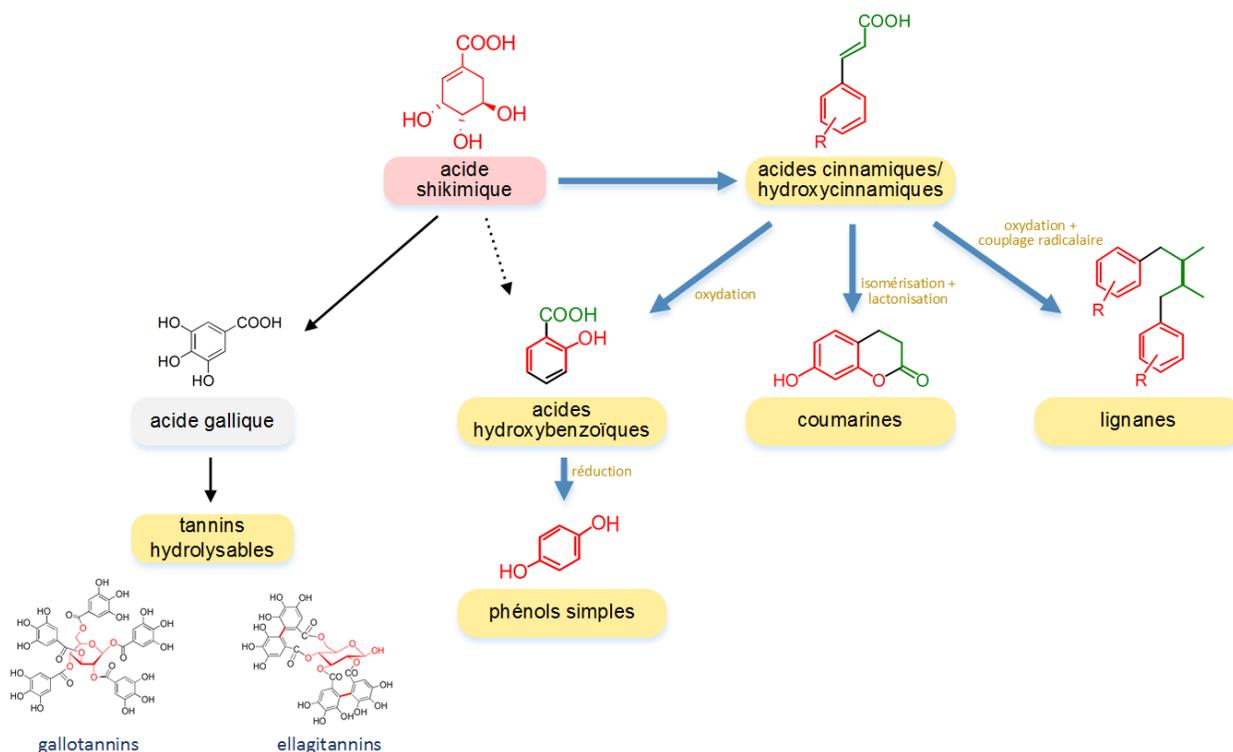


Figure I.15 : Composés phénoliques issus de la voie de l'acide shikimique. Adaptation libre de droits (Vercauteren 2011).

### I.2.3.2.2. Les composés phénoliques

Avec plus de 8000 structures différentes identifiées au sein du règne des végétaux, les composés phénoliques se caractérisent par définition par au moins un cycle aromatique substitué par au moins un groupement hydroxyle correspondant à une fonction phénol (Strack 1997). Il est important de préciser que malgré le caractère hydrophile conféré par les groupements hydroxyles, les noyaux aromatiques de ces composés rendent les génines phénoliques plutôt amphiphiles. Lorsque les composés phénoliques sont glycosylés, comme c'est souvent le cas chez les plantes, l'hydrophilie domine (Bruneton 2009). À noter qu'on parle ici de composés phénoliques et non de « polyphénols », terme courant mais trop restrictif

puisqu'il nécessite au moins deux aromatiques, chacun au moins di-hydroxylés. Ce terme est également trop peu précis puisque les polymères basés sur la lignine répondant à ces critères ne sont pas considérés comme des polyphénols contrairement aux : 1) tannins condensés (proanthocyanidines), 2) tannins hydrolysables (gallo- et ellagitannins) et 3) phlorotannins, non développés ici compte tenu de leur faible occurrence chez les végétaux par rapport à leur abondance chez certains types d'algues ne faisant pas partie du règne des plantes (Meslet-Cladiere *et al.* 2013 ; Quideau *et al.* 2011).

Au sein de la plante, les composés phénoliques ont des rôles variés (défense contre les herbivores, les pathogènes, allelopathie, pigments pour favoriser zoogamie et zoochorie) associés à des propriétés biologiques spécifiques (Croteau *et al.* 2000). Ainsi, ils sont de plus en plus étudiés pour leur bioactivité visant des bienfaits potentiels sur la santé humaine. Bien que ces effets à long terme sur la santé restent au stage de l'étude, une grande majorité de ces composés phytochimiques semblent propices à limiter les procédés d'oxydation au sein du corps par leur capacité à piéger les radicaux libres. Ils sont alors qualifiés d'antioxydants (Foti 2007 ; Liu 2003). L'activité antioxydante des composés phénoliques et plus généralement des extractibles sera plus développée dans la partie I.3.2.5.

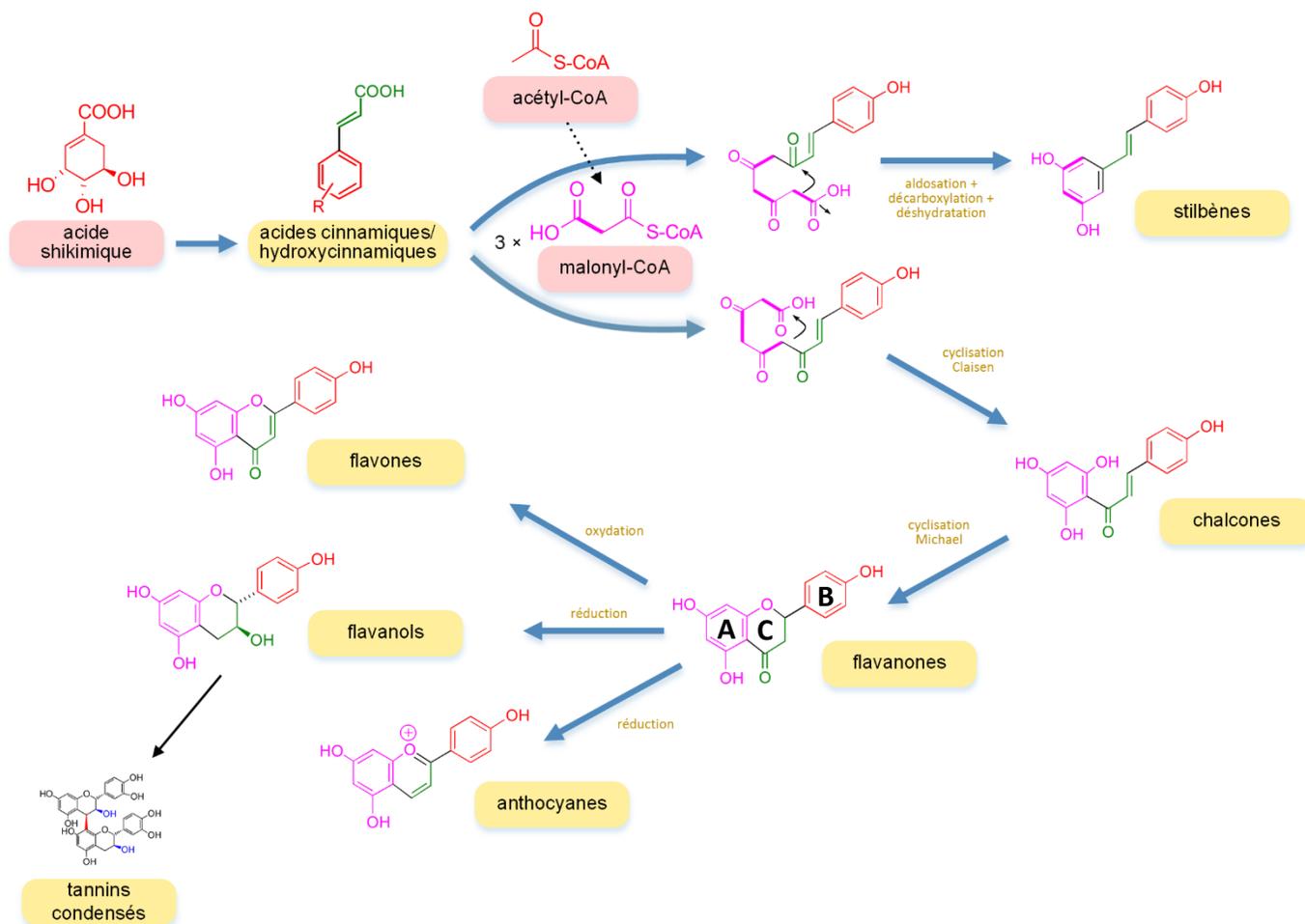


Figure I.16 : Voie mixte shikimates/acétates à l'origine des flavonoïdes et stilbènes. Adaptation libre de droits (Vercauteren 2011).

Pour présenter les composés phénoliques potentiellement extractibles de l'écorce, la classification a été basée sur leurs voies métaboliques associées, puis de manière secondaire sur le nombre et l'arrangement de leurs carbones. Ainsi, nous nous sommes premièrement intéressés aux composés phénoliques dérivés d'un squelette phénylpropane et purement issus de la voie des shikimates tels que présentés en **Figure I.15**. Il est important de noter que presque tous les composés phénoliques issus de l'acide shikimique dérivent des acides cinnamiques et hydroxycinnamiques (acides hydroxybenzoïques, phénols simples, coumarines et lignanes). Les exceptions concernent certains acides hydroxybenzoïques particuliers comme l'acide gallique à l'origine des tannins hydrolysables (gallo- et ellagitannins) parmi d'autres dérivés.

Dans un second temps, les composés issus d'une voie mixte mêlant shikimates et acétates ont été détaillés. Ceux-ci sont originaires des dérivés phénylpropanes (acides cinnamiques/hydroxycinnamiques) issus de l'acide shikimique qui après activation par la coenzyme A réagissent par condensations successives avec la malonyl-CoA (dérivée de l'acétyl-CoA). Les structures formées sont soit de type flavonoïde, soit de type stilbène (**Figure I.16**), elles seront présentées en I.2.3.2.2.5. et I.2.3.2.2.6., respectivement.

#### I.2.3.2.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques ou acides-phénols sont issus, comme la majorité des composés phénoliques, de la voie des shikimates. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les acides hydroxycinnamiques et les acides benzoïques (Bruneton 2009).

##### *Acides hydroxycinnamiques*

À partir de l'acide shikimique et suite à la biogénèse des acides cinnamiques ou phénylpropanes (**Figure I.15**), on obtient des acides-phénols C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> appelés hydroxycinnamiques (cycle à 6 lié à une chaîne alcène à 3 carbones). Ceux-ci vont être à la base des autres composés phénoliques issus de la voie des shikimates : les acides hydroxybenzoïques, les phénols simples, les coumarines et les lignanes. Le genre *Acer* est généralement riche en dérivés phénylpropanes simples issus d'acides hydroxycinnamiques (Bi *et al.* 2016). Quelques structures ont été identifiées dans le sirop d'érable (Li, L. et Seeram 2010). Toutefois, peu d'hydroxycinnamiques ou hydroxycinnamates ont été rapportés. Parmi ceux-ci, les acides *p*-coumarique, caféique et férulique dans les bourgeons en dormance d'érable à sucre et l'acide chlorogénique (**Figure I.17**) au sein des feuilles de cette même essence (Hatano *et al.* 1990 ; Thakur 1977).

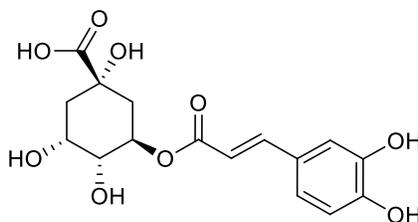


Figure I.17 : Acide chlorogénique, hydroxycinnamique de l'érable à sucre.

### Acides hydroxybenzoïques et tannins hydrolysables

Il est également possible de faire subir à l'acide cinnamique ou *p*-hydroxycinnamique, une oxydation menant à des composés C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (**Figure I.15**). Les acides-phénols formés, qualifiés d'acides hydroxybenzoïques, sont caractérisés par une chaîne alkyle plus courte. Leur cycle aromatique substitué présentant une fonction acide carboxylique et au moins une fonction phénol (Vercauteren 2011). Les acides vanillique et syringique ont été identifiés chez l'érable à sucre (Li, L. et Seeram 2010 ; Thakur 1977), leurs esters méthylés respectifs se retrouvant dans l'écorce et les ramilles d'érable rouge, au même titre que l'acide 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoïque et son ester de méthyle (Bi *et al.* 2016). Des hétérosides de dérivés d'acides gentisique et vanillique ont été isolés pour la première fois dans l'écorce d'érable à sucre : les saccharumosides B, C et D (Yuan *et al.* 2011). À titre d'exemple, le saccharumoside C est figuré ci-après (**Figure I.18**).

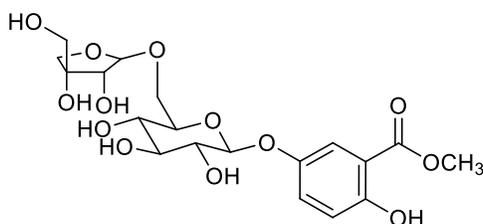


Figure I.18 : Saccharumoside C, glycoside hydroxybenzoïque spécifique de l'écorce d'érable à sucre.

Largement présents chez les érables (moins chez l'érable à sucre), on retrouve l'acide gallique (AR) et ses dérivés simples : gallate de méthyle (AR, AS), gallate d'éthyle (AR), *m*-digallate (AR, AS), *m*-digallate d'éthyle (AR), acide 4-*O*-méthylgallique (AR) (Bi *et al.* 2016 ; Wan *et al.* 2012b). Comme précédemment représenté en **Figure I.15**, l'acide gallique est un acide hydroxybenzoïque particulier pouvant être obtenu directement à partir de l'acide shikimique par réactions d'oxydation et d'énolisation, sans passer par les acides cinnamiques. Des réactions enzymatiques permettent de greffer un polyol à l'acide gallique avant que plusieurs groupements galloyles puissent à leur tour être rattachés au polyol, formant ainsi des tannins hydrolysables appelés gallotannins (Crozier *et al.* 2006 ; Dewick 2002 ; Vercauteren 2011).

### Gallotannins

Le polyol sur lequel sont greffés les groupements galloyles des gallotannins est généralement un sucre, souvent le D-glucose (Khanbabaee et van Ree 2001). Ainsi, des gallotannins, glucosides de l'acide gallique ont été identifiés exclusivement chez l'érable rouge : 1-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose, 3-methoxy-4-hydroxyphenol-1-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*-galloyl)-glucopyranoside et rubrumoside B (possédant également un groupement gentisate de méthyle), ainsi que des galotannins basés sur des désoxy-oses, le 1-*O*-galloyl- $\alpha$ -L-rhamnose et les maplexines (Bi *et al.* 2016). Gallotannins propres à l'érable rouge, les maplexines A, B (un galloyle), C, D (deux galloyles), E, F (trois galloyles), G, I (deux galloyles et un 3-methoxygalloyle) et H (deux galloyles et un vanilloyle) sont centrés autour d'un noyau 1,5 anhydroglucitol. Ces composés ont des structures de même type que les ginnalines A, B, C et « 3,6 », d'autres gallotannins basés sur un noyau 1,5-anhydroglucitol. La ginnaline A est décrite en **Figure I.19**. Les ginnalines sont présentes chez quelques

espèces d'érable: *Acer ginnala* qui leur donne son nom et dont les propriétés médicinales sont reconnues, ainsi que l'érable rouge (bois, écorce, bourgeons) et l'érable à sucre (feuilles) (Hatano *et al.* 1990 ; Meda *et al.* 2017b ; Wan *et al.* 2012a ; Yuan *et al.* 2012). Les maplexines et ginnalines ont fait l'objet de plusieurs études démontrant l'implication du noyau glucitol dans plusieurs type d'activités : antiproliférative sur des cellules cancéreuses (colon, peau), antioxydante (piégeage de radicaux et chélation de métaux) et anti-diabète (activité d'antiglycation et inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase) (González-Sarrías *et al.* 2012b ; Ma *et al.* 2016, 2017).

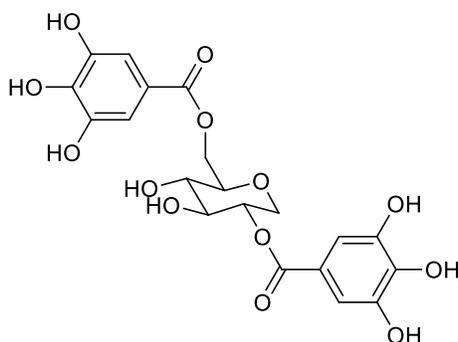


Figure I.19 : Ginnaline A ou « accertannin », gallotannin spécifique du genre *Acer*.

#### *Ellagitannins*

Caractérisés par au moins une liaison C-C (2-2') et parfois une ou plusieurs liaisons C-O-C, couplant deux groupements galloyles, les ellagitannins ou tannins ellagiques sont le groupe le plus important en termes d'individus parmi les tannins. La plupart sont des tannins hydrolysables centrés sur un polyol, néanmoins les ellagitannins peuvent aussi être non-hydrolysables dans le cas de C-hétérosides *i.e.* lors de la présence d'une liaison C-C entre le cycle du groupement galloyle et le polyol (Khanbabaee et van Ree 2001). Deux exemples d'ellagitannins ont été isolés dans les feuilles d'érable à sucre. La géraniine (deux liaisons C-C et une C-O), présente assez largement dans les *Aceraceae*, et la davidiine (une seule C-C) d'occurrence plus limitée (Bi *et al.* 2016 ; Hatano *et al.* 1990). De l'hydrolyse des ellagitannins, un dilactone, l'acide ellagique (**Figure I.20**) peut être biosynthétisé (Dewick 2002). Celui-ci se retrouve chez quelques espèces du genre *Acer* dont l'érable rouge (feuilles, bourgeons) et l'érable à sucre (feuilles) (Abou-Zaid *et al.* 2001 ; Meda *et al.* 2017b ; Sager *et al.* 2005).

#### **I.2.3.2.2. Phénols simples**

Les phénols simples peuvent être obtenus par réduction des acides hydrobenzoïques (**Figure I.15**). Généralement rares dans la nature, on les retrouve souvent sous forme d'hétérosides ou de dérivés divers. C'est le cas au sein de l'érable à sucre (sirop, écorce) où les noyaux phénoliques sont souvent carbonylés (aldéhydes, cétones voire cétole). On retrouve par exemple des dérivés de l'acétophénone et de la vanilline tels que le vanilloside (**Figure I.21**), mais aucun dérivé des phénols simples n'a été détecté dans l'érable rouge (Bi *et al.* 2016 ; Yuan *et al.* 2011).

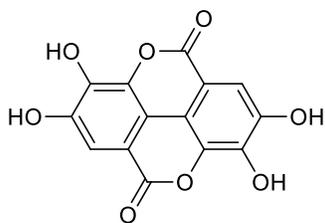


Figure I.20 : Acide ellagique, produit de l'hydrolyse des ellagitannins.

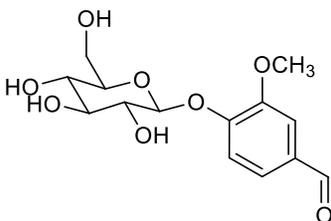


Figure I.21 : Vanilloside, glucoside phénolique de l'écorce d'érable à sucre.

### I.2.3.2.2.3. Coumarines

Biosynthétisées à partir des acides hydroxycinnamiques, les coumarines sont donc des composés phénoliques également issus de la voie des shikimates (**Figure I.15**). L'action enzymatique conjuguée de l'isomérase et de l'ortho-oxydase permet respectivement le passage de l'alcène (figuré en vert) du stéréoisomère E au Z et le greffage d'un hydroxyle phénolique (en rouge) de manière à ce que la chaîne alkyle (en vert) et le groupement hydroxyle soit en position ortho l'un par rapport à l'autre. Une estérification intramoléculaire ou lactonisation forme alors un ester cyclique (lactone), menant à une structure de coumarine.

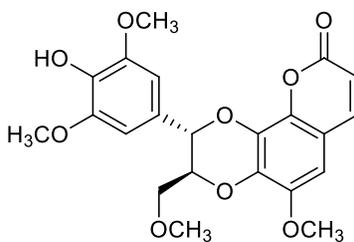


Figure I.22 : Clémiscosine D, coumarino-lignane de l'érable à sucre.

Quelques exemples de coumarines sont présents dans le genre *Acer* et particulièrement chez l'érable à sucre. Parmi les coumarines de structure simple, la fraxétine est la seule coumarine isolée de l'érable rouge (tronc *i.e.* bois ou bois/écorce), tandis que la scopolétine et son glucoside, la scopoline ont été isolées respectivement dans le bois et l'écorce d'*Acer saccharum* (Wan *et al.* 2012b ; Yoshikawa *et al.* 2011 ; Yuan *et al.* 2011). L'érable à sucre (bois) recèle également des coumarines aux structures plus complexes, des substances de type coumarino-lignanes. Si les cléomiscosines A et B n'ont été que partiellement élucidées, les structures des cléomiscosines C, D et de la 5'-deméthylaquillochine ont bien été confirmées (Ray *et al.* 1985 ; Yoshikawa *et al.* 2011). La cléomiscosine D est présentée ci-après (**Figure I.22**).

#### I.2.3.2.2.4. Lignanes

Considérés principalement comme des métabolites secondaires du duramen dans le bois mais largement répandus au sein des plantes lignocellulosiques, les lignanes (**Figure I.15**), comme leur nom l'indique ont des structures proches de celles de la lignine. En effet, ces composés bioactifs partagent une voie de biosynthèse similaire (voie des shikimates). Leur formation est basée sur un couplage de monolignols : alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (eux-mêmes issus des acides hydroxycinnamiques). Selon la position du site du couplage radicalaire sur les deux unités monolignols, plusieurs types de lignanes peuvent être produits. Les lignanes « conventionnels » sont issus d'un couplage en 8-8' ( $\beta$ - $\beta'$ ), comme les cyclolignanes qui eux présentent une cyclisation à six carbones de la chaîne alkyle liant les deux aromatiques. Les néolignanes peuvent être biosynthétisés à partir de couplages en d'autres positions et forment généralement une structure déshydrobenzofurane entre les deux cycles aromatiques. À noter qu'on parle d'oxynéolignanes lorsque le couplage de type C-O-C forme une chaîne linéaire substituée par des groupements hydroxyles (Bruneton 2009 ; Dewick 2002 ; Stevanovic et Perrin 2009).

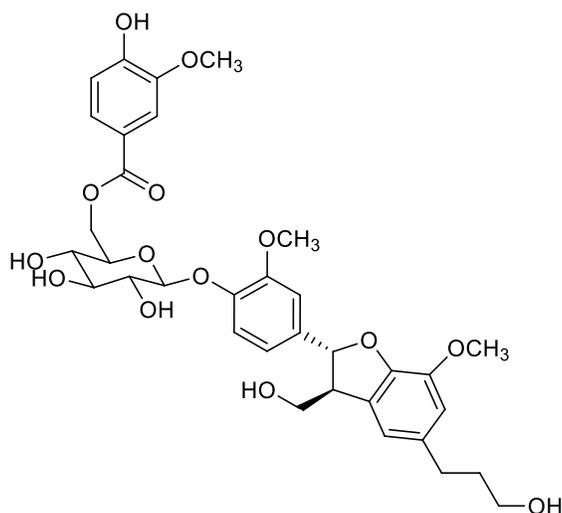


Figure I.23 : Saccharumoside A, néolignane spécifique de l'écorce d'érable à sucre.

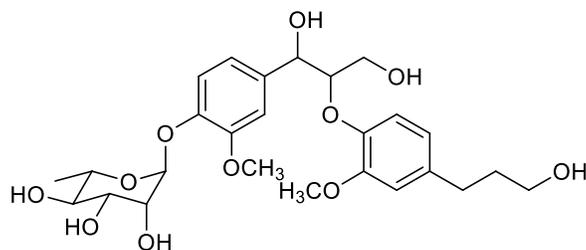


Figure I.24 : Rubrumoside A, oxynéolignane spécifique de l'écorce d'érable rouge.

La grande majorité des lignanes identifiés chez les érables l'ont été chez l'érable à sucre (sirop, sève, écorce, bois). Hormis, huit lignanes conventionnels issus de l'érable à sucre, un seul autre a été identifié dans l'érable rouge (tronc), la nortrachélogénine-8'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. Enfin, trois cyclolignanes ont été identifiés dans l'érable à sucre (Bi *et al.* 2016). Parmi les neuf néolignanes de l'érable à sucre, on trouve deux

hétérosides de type déshydrobenzofurane, l'icaricide E4 (bois) ainsi qu'un nouveau composé propre à l'écorce (**Figure I.23**), le saccharumoside A (Yoshikawa *et al.* 2011 ; Yuan *et al.* 2011). De structures proches, le rubrumoside A (**Figure I.24**) et le nymphaeoside A sont des oxynéolignanes glycosylés de l'érable rouge (écorce), tandis que les 11 autres oxynéolignanes du genre *Acer* sont issus de l'érable à sucre (sirop, sève).

#### I.2.3.2.2.5. Flavonoïdes

La voie mixte shikimates/acétates présentée en **Figure I.16** est susceptible de produire deux grands types de composés particuliers issus de deux types d'aromagénèse. Selon l'orientation de la polycondensation de la malonyl-CoA, il est possible de produire soit des structures de type stilbène, soit des flavonoïdes (Dewick 2002 ; Vercauteren 2011). Les flavonoïdes sont des pigments et co-pigments presque universels des plantes participant à leur coloration. Ces caractéristiques sont prépondérantes pour favoriser la zoogamie (pollinisation par les animaux). Avec plus de 1000 génines identifiées et presque le double de *O*- et *C*-hétérosides, c'est plus de 3000 flavonoïdes qui ont été mis en évidence à ce jour (Bruneton 2009).

##### *Chalcones*

Les chalcones sont les premiers flavonoïdes à être biosynthétisés suite à une cyclisation de type « Claisen » du dérivé hydroxycinnamique/malonyl-CoA (**Figure I.16**), formant ainsi un cycle phénolique, généralement substitué selon un motif phloroglucinol (cycle A), en plus du cycle issu de l'hydroxycinnamique (cycle B). Parmi ces composés dicycliques, la phloridzine est présente chez l'érable rouge (tronc). La phloridzine est le premier et seul composé du type chalcone recensé dans le genre *Acer* (Wan *et al.* 2012b).

##### *Flavanones*

Les flavanones sont formées directement à partir des chalcones grâce à l'action d'une enzyme (chalcone isomérase) par addition nucléophile 1,4 de Michael (**Figure I.16**). Cette réaction intramoléculaire permet la perte de la double liaison en position C-2–C-3 ainsi que la formation d'un hétérocycle (cycle C) (Vercauteren 2011). Si quelques flavanones (4) ont été identifiées chez *Acer pictum* Thunb., de tels composés n'ont jamais été isolés dans les spécimens *Acer rubrum* L. et *Acer saccharum* Marsh. (Bi *et al.* 2016).

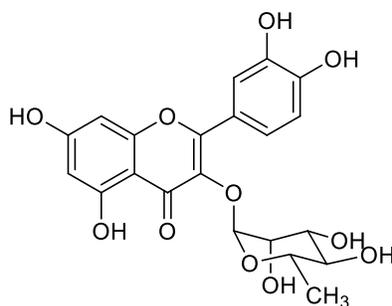


Figure I.25 : Quercitrine, flavanol présent chez l'érable à sucre et l'érable rouge.

Des flavanones, dérivent des structures secondaires plus mineures tels que les dihydroflavonols (flavanones substitués par un hydroxyle en C-2) (Crozier *et al.* 2006). Un seul exemple de telles structures a été mis en évidence dans le genre *Acer*, la dihydromyricétine, chez *Acer tegmentosum* Maxim. (Bi *et al.* 2016).

### ***Flavones et flavonols***

Cette catégorie de flavonoïdes est biosynthétisée par une oxydation des flavanones, permettant la formation d'une double liaison en position C-2–C-3 (**Figure I.16**). Aucune flavone n'a été reportée chez les érables rouge et à sucre malgré la présence de sept structures chez les *Aceraceae*. Toutefois, les flavonols, dérivés hydroxylés (en C-3) des flavones sont largement représentés avec 35 structures dont une seule chez *Acer saccharum* Marsh. (feuilles), la quercétine-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside ou quercitrine (**Figure I.25**). Celle-ci est également présente chez *Acer rubrum* L. au même titre que la quercétine et sept autres de ses 3-*O*-hétérosides (feuilles, tronc, bourgeons), ainsi que trois dérivés de type kaempferol-3-*O*-glycoside (feuilles) (Bi *et al.* 2016 ; Meda *et al.* 2017b).

À noter également l'existence d'isoflavones pour lesquelles le cycle B lié en C-3 au lieu de C-2 sur le cycle C), mais au sein des érables, une seule isoflavone a été isolé (5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone) chez *Acer negundo* L. (Bi *et al.* 2016).

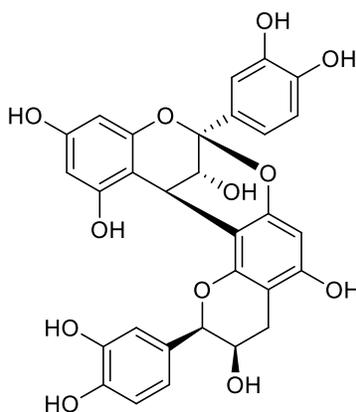


Figure I.26 : Procyanidine A2, tannin condensé de l'érable rouge.

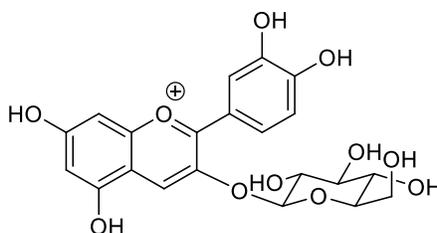
### ***Flavanols, tannins condensés***

Issus des flavanones par réactions de réduction (perte du carbonyle en C-4 au profit d'un alcool en C-3), les flavanols (**Figure I.16**) peuvent se retrouver dans les extraits d'*Aceraceae* sous forme simple ou de tannins condensés (polymères de flavanols). Peu de flavanols (5) sont recensés au sein des érables. Parmi eux, la catéchine, son épimère l'épicatéchine et l'épicatéchine-3-*O*-gallate ont été isolés chez l'érable rouge (tronc). Les tannins condensés du genre *Acer* ont uniquement été mis en évidence chez l'érable rouge (tronc) : deux procyanidines de type A, la procyanidine A2 (**Figure I.26**) possédant deux liaisons interflavaniques  $\beta$  (C4-C8) et  $\beta$  (C2-O)-C7 et la procyanidine A6,  $\beta$  (C4-C6) et  $\beta$  (C2-O)-C7 (Wan *et al.* 2012b). Précédemment, deux procyanidines, un dimère et un trimère de flavanol avaient été identifiés, respectivement dans le bois et

l'écorce d'érable rouge. Si l'absence de liaison étheroxyde inter-monomères indique deux procyanidines de type B et C respectivement, la structure chimique n'a été élucidée que partiellement, la stéréochimie n'ayant pas été établie (Narayanan et Seshadri 1969).

### ***Anthocyanes***

La réduction des flavanones est également susceptible de former des composés chargés positivement, les anthocyanes (**Figure I.16**). Ces composés sont des pigments (rouge, bleu, violet) très présents dans les fruits mais également dans les tissus des feuilles, du tronc ou même des racines. Huit anthocyanes ont été mis en évidence chez le genre *Acer* dont deux chez l'érable rouge (bourgeons) (Bi *et al.* 2016 ; Meda *et al.* 2017b). Uniquement un de ces deux anthocyanes glycosylés a été totalement élucidé, la cyanidine-3-*O*-glucoside ou chrysanthémine (**Figure I.27**).



*Figure I.27 : Chrysanthémine, anthocyane des bourgeons de l'érable rouge.*

#### **I.2.3.2.6. Stilbènes**

Également issus de la voie mixte shikimates/acétates, les stilbènes, plus généralement appelés stilbénoides (pour souligner leur biogénèse commune aux flavonoïdes) se caractérisent par une structure diphenyléthène ou diphenyléthane (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) comme illustré en **Figure I.16**. Ces composés sont parfois des phytoalexines, des agents sécrétés par les plantes en réponse aux attaques de pathogènes fongiques, bactériens ou viraux. Ceci confère à ces substances d'intéressantes propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. L'exemple le plus célèbre étant le *trans*-resvératrol glucosylé présent dans les raisins et le vin (Bruneton 2009 ; Crozier *et al.* 2006). Parmi les huit stilbènes des érables, trois diphenyléthanes et trois diphenyléthènes ont été identifiés dans l'érable à sucre (sirop) dont le (E)-3,3'-diméthoxy-4,4'-dihydroxystilbène (**Figure I.28**) (Bi *et al.* 2016).

#### **I.2.3.2.3. Les protéines**

Les peptides et les polypeptides, regroupés sous le terme générique « protéines », sont des métabolites primaires souvent hydrosolubles pouvant être biosynthétisés à partir des acides aminés issus des shikimates ou bien du cycle de Krebs impliqué dans la respiration cellulaire (**Figure I.10**). On parle généralement de protéines pour des peptides de longueurs de chaînes supérieures à 40 résidus d'acides aminés. Malgré environ 300 acides aminés connus au sein des plantes, uniquement une vingtaine d'entre eux

sont impliqués dans les structures polymériques des peptides et protéines végétales (**Figure I.29**) (Bruneton 2009 ; Dewick 2002).

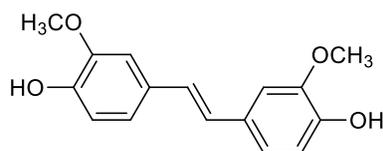


Figure I.28 : (E)-3,3'-diméthoxy-4,4'-dihydroxystilbène, stilbène du sirop d'érable.

Les composés protéiques sont impliqués dans un large spectre de fonctions biologiques en tant que molécules structurales, enzymes, antibiotiques ou encore neurotransmetteurs. Parmi ces fonctions de base, on retrouve en particulier chez les végétaux vivaces la nécessité de stocker, remobiliser et réutiliser l'azote lors de leur période de dormance (hiver). Ainsi il existe, en particulier dans l'écorce, des protéines de stockage, réserves d'acides aminés essentiels dont le rôle est de pouvoir biosynthétiser de nouvelles protéines selon les besoins de la plante (Islam *et al.* 2015). À titre d'exemple, deux types de protéines de stockage (16 et 24 kDa) ont été mises en évidence au sein de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre en dormance (Wetzel *et al.* 1989).

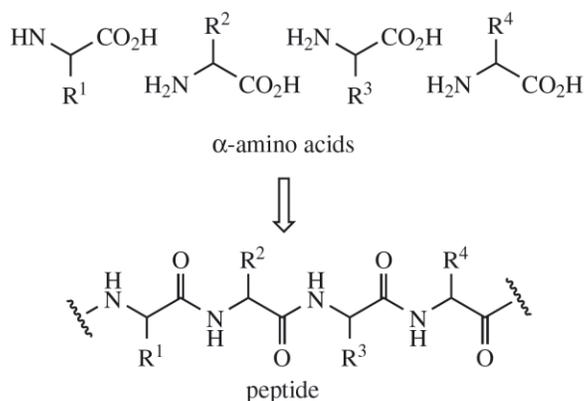


Figure I.29 : Structure de base des peptides.  
Reproduction de Dewick (2002) avec autorisation de Wiley.

Malgré l'intérêt pour la santé humaine des bioactivités de ces composés (antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancer), certaines protéines et acides aminés des plantes peuvent s'avérer toxiques. Parmi ces composés toxiques on trouve les protéines inactivant les ribosomes (PIR), les lectines, les ureases ou encore les arcelines dont le rôle originel au sein de la plante est souvent la lutte contre les pathogènes et les prédateurs (Dang et Van Damme 2015). Les acides aminés toxiques sont quant à eux souvent non-protéiques. Leur toxicité s'exprime par leur similarité stérique avec certains acides aminés utilisés dans le métabolisme de prédateurs éventuels. N'étant pas distingués par les systèmes enzymatiques, ils sont utilisés lors de la biosynthèse protéique rendant les protéines non fonctionnelles. À titre d'exemple, la mimosine, les hypoglycines et les séléno-aminoacides sont toxiques pour les être humains (Bruneton 2009). Compte tenu de l'extraction possible de tels composés, l'utilisation d'un extrait naturel en tant que *totum* pour des applications sur l'humain nécessite d'établir au préalable un seuil de toxicité.

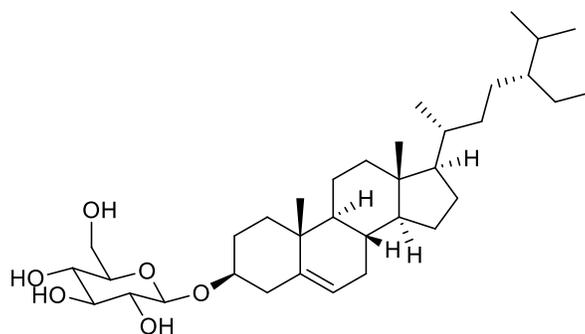


Figure I.30 : Daucostérol, saponoside monodesmoside stéroïdique de l'érable à sucre.

#### I.2.3.2.4. Les saponosides : triterpènes et stéroïdes glycosylés

Les saponosides sont des métabolites secondaires dérivant de la voie du mévalonate (**Figure I.10**) comme les triterpènes et stéroïdes (présentés par la suite en I.3.2.3.1.) dont ils sont les *O*-hétérosides. À noter qu'ils ne sont pas les seuls stéroïdes glycosylés puisqu'il existe également des hétérosides cardiotoniques (C<sub>23-24</sub>), famille de composés assez restreinte non-développée ici. La présence d'une structure glucidique chez les saponosides leur confère un caractère hydrosoluble accru (les terpénoïdes et les stéroïdes étant plutôt apolaires). Relativement peu toxiques par ingestion (ils sont présents dans des aliments tels que les haricots, lentilles ou les épinards), les saponosides sont des tensioactifs naturels reconnus pour leurs propriétés moussantes (Bruneton 2009 ; Dewick 2002).

En termes de biosynthèse, suite à la conversion de l'acide mévalonique en IPP, celui-ci peut s'isomériser en DMAPP (diméthylallyl-pyrophosphate) plus électrophile que l'IPP. Cette différence de réactivité va mener à de multiples réactions enzymatiques impliquant ces deux unités isoprènes puis les polyisoprènes formés, pour construire les squelettes de différentes classes de terpènes, parmi lesquelles on retrouve les triterpènes (C<sub>30</sub>). À partir des triterpènes sont formés suite à la perte de groupements méthyles, les stéroïdes organisés autour de quatre cycles (noyau stérane). Leur taille est donc généralement inférieure aux triterpènes et peut être variable (souvent C<sub>27</sub> voire C<sub>28-29</sub> pour les phytostérols, stéroïdes spécifiques de végétaux). La biogénèse des triterpènes et des stéroïdes est plus amplement détaillée en I.2.3.3.1. Les saponosides, dérivés glycosylés de ces deux types de composés sont donc qualifiés soit de saponosides à génine stéroïdique ou bien de saponosides à génine triterpénique. La liaison osidique des deux types de saponosides se fait en C-3 en lieu et place de l'hydroxyle, on parle alors de monodesmosides. Toutefois, il est possible d'estérifier le carboxyle en C-28 des monodesmosides triterpéniques ou d'éthérifier (lorsqu'il existe) l'hydroxyle en C-26 des monodesmosides stéroïdiques pour former des bidesmosides. À noter qu'il existe quelques tridesmosides (Bruneton 2009). Au sein des érables, six saponosides ont été identifiés (Bi *et al.* 2016) : un monodesmoside triterpénique dérivé de l'oléanane, deux bidesmosides triterpéniques ursaniques et des monodesmosides stéroïdiques (dérivés du  $\beta$ -stigmastérol et du  $\beta$ -sitostérol) dont le daucostérol (**Figure I.30**), phytostérol glucosylé mis en évidence au sein de l'érable à sucre (fruits).

### I.2.3.3. Les extractibles lipophiles

Les extractibles lipophiles présentés ici, car partageant des voies de biosynthèse avec les composés hydrophiles détaillés en I.3.2.1., sont très peu susceptibles d'être extraits à l'eau (solvant de l'étude). Ainsi, les terpénoïdes, stéroïdes, alcaloïdes et lipides seront rapidement évoqués dans cette partie.

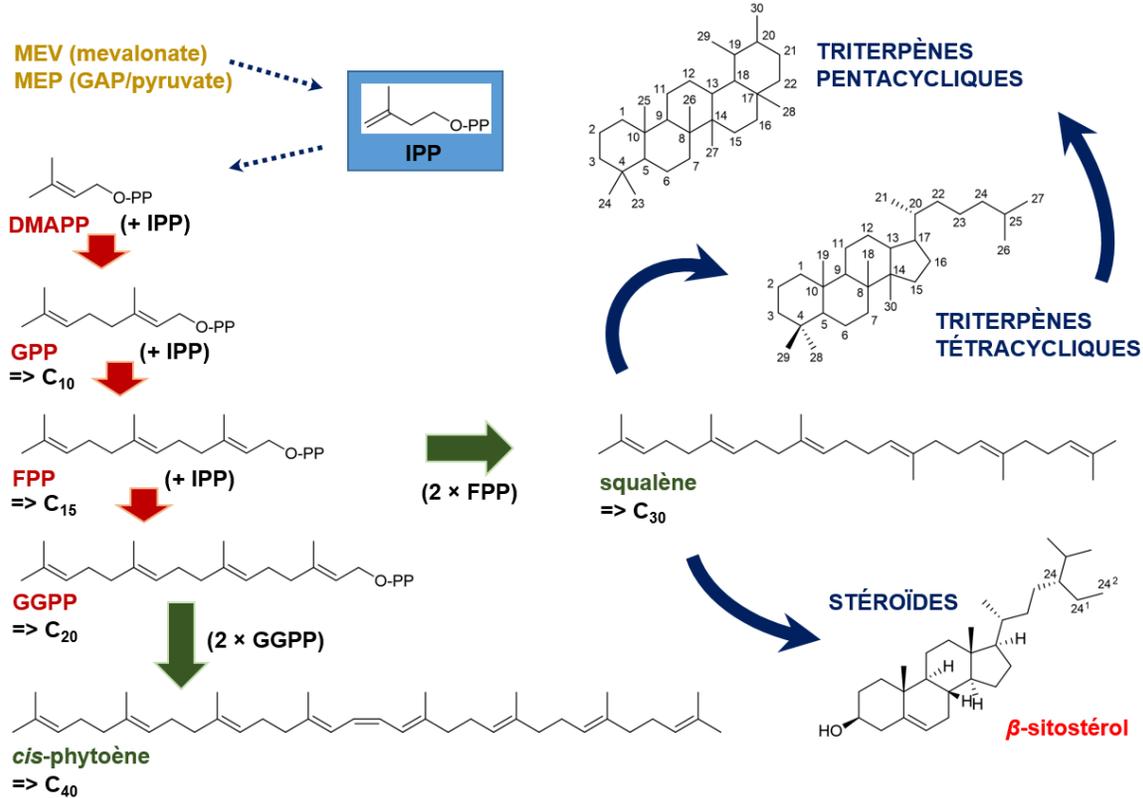


Figure I.31 : Schéma récapitulatif de la formation des précurseurs des différentes classes de terpènes et des stéroïdes (e.g. β-sitostérol).

#### I.2.3.3.1. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Comme évoqué en I.2.3.1., outre la voie du mévalonate, l'origine biosynthétique de l'IPP à la base des terpénoïdes végétaux peut être la voie du MEP, parfois nommée voie GAP/pyruvate. Brièvement, de la réaction entre le pyruvate et le phosphate de glycéraldéhyde (GAP) résulte une décarboxylation entraînant la formation d'intermédiaires hydroxylés qui, suite à des réactions enzymatiques de transposition, réduction fournissent le MEP et, après déshydratation, l'IPP. La biogénèse des structures à l'origine de dérivés terpénoïdes et stéroïdes est synthétisée en **Figure I.31**. Comme évoqué en I.3.2.2.4., l'IPP et son isomère DMAPP réagissent enzymatiquement par addition électrophile. Est formé le GPP (géranyl-pyrophosphate), précurseur des monoterpènes (C<sub>10</sub>) comprenant des composés de base des huiles essentielles ou encore les iridoïdes. Par la suite, les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) sont issus du FPP (farnésyl-pyrophosphate), couplage du GPP et de l'IPP, les diterpènes (C<sub>20</sub>) du GGPP ou géranyl-géranyl-pyrophosphate (FPP + IPP) et les sesterterpènes (C<sub>25</sub>) du GFPP, géranyl-franésyl-pyrophosphate (GGPP + IPP). Les triterpènes (C<sub>30</sub>) et les carotènes (C<sub>40</sub>) ne suivent pas exactement le même schéma puisqu'ils sont respectivement les dérivés du squalène (couplage

réductif de  $2 \times$  FPP) et du phytoène ( $2 \times$  GGPP). La cyclisation du squalène fournit des triterpènes pouvant être pentacycliques mais aussi tétracycliques. C'est à partir d'une suite d'oxydations et de décarboxylation de dérivés triterpènes tétracycliques que sont accessibles les stéroïdes ( $C_{27}$ ) ainsi déméthylés. Les phytostérols ( $C_{28-29}$ ), stéroïdes végétaux possèdent en plus d'une génine stéroïde classique un hydroxyle en position C-3 et un groupe méthyle ou éthyle en C-24 (Bruneton 2009 ; Crozier *et al.* 2006 ; Dewick 2002).

La capacité des terpénoïdes à pénétrer les membranes cellulaires (lipophiles) fait tout l'intérêt de ces molécules bioactives, en particulier par rapport aux composés phénoliques polaires qui démontrent plus de problèmes de bioaccessibilité. Au sein des érables, on recense 24 terpénoïdes et 8 phytostérols dont le  $\beta$ -sitostérol (**Figure I.31**), présent à la fois chez l'érable rouge et l'érable à sucre (écorces et bois) parmi 5 autres espèces d'*Acer* (Bi *et al.* 2016 ; St-Pierre, F. *et al.* 2013).

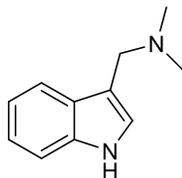


Figure I.32 : Gramine, alcaloïde de l'érable rouge.

### I.2.3.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances assez répandues chez les angiospermes (27 000 alcaloïdes issus de 21 000 plantes). Ils sont reconnus pour leurs activités pharmacologiques, en particulier au niveau du système nerveux. Tout comme les protéines, les alcaloïdes vrais dérivent des acides aminés (**Figure I.10**), leur structure complexe se caractérise par la présence d'un atome d'azote dans un système hétérocyclique. D'autres composés, les pseudo-alcaloïdes (alcaloïdes terpéniques) et les proto-alcaloïdes (amines simples, atome d'azote généralement non-inclus dans un hétérocycle) complètent la famille des alcaloïdes. Toutefois cette classification n'est pas parfaite et certains composés demeurent difficiles à classer. On peut alors se référer à une classification basée sur les précurseurs des alcaloïdes (Bruneton 2009 ; Crozier *et al.* 2006 ; Dewick 2002) :

- D'origines variés pour les pseudo-alcaloïdes (acétate, pyruvate, acides hydroxycinnamiques, terpénoïdes...).
- Tyrosine, tryptophane et ornithine pour générer les noyaux phényléthylamine, indole et pyrrolizidine, respectivement, dont dérivent les proto-alcaloïdes.
- Ornithine/lysine, acide nicotinique, phénylalanine/tyrosine, tryptophane, histidine et acide anthranilique permettant d'accéder aux noyaux pyrrolidine, pipéridine, pyrrolizidine, quinolizidine, tropane, isoquinoléine, indole, imidazole et quinoléine des alcaloïdes vrais.

Si les alcaloïdes sont complètement insolubles dans l'eau sous leur forme basique (et donc peu susceptibles d'être détectés dans des extraits à l'eau chaude), ils forment des sels suite à l'action d'un acide et deviennent alors très hydrosolubles (Bruneton 2009). De plus, ces composés ont été très peu isolés chez le

genre *Acer* avec seulement trois occurrences dont une chez l'érable rouge (fruits), la gramine (**Figure I.32**) (Bi *et al.* 2016).

### **I.2.3.3.3. Les lipides et acides gras**

Autres composés à tendance lipophile, voire parfois amphiphile, les lipides végétaux sont principalement issus de la voie des acétates (**Figure I.10**). Ils sont formés par multiples condensations de Claisen, générant ainsi leur structure polymérique linéaire caractéristique (Dewick 2002). Ils sont classés en tant que lipides simples lorsque ce sont des esters combinant un ou plusieurs acides gras et un alcool (glycérol ou alcools aliphatiques de masse moléculaire élevée). On parle de lipides complexes pour les glycolipides (hétérosides) et les phospholipides (incluent un groupe phosphate les rendant amphiphiles). Les huiles végétales, utilisées en pharmacotechnie, pour des formulations cosmétiques ou dans l'industrie agroalimentaire, sont basées sur des lipides simples, les triglycérides. Les acides gras, qui constituent avec le glycérol ces esters triglycérides ou triacylglycérols, peuvent être saturés ou insaturés. Les insaturations de ces derniers s'enchaînent généralement avec alternance de deux liaisons simples entre chaque double liaison (motifs 1,4-diènes). Au sein des végétaux, ces insaturations sont le plus souvent *cis* (*Z*) mais suite à une hydrogénation partielle (rayonnement, température, oxydation...), les isomères *trans* (*E*) naturellement présents dans les triglycérides animaux sont susceptibles d'être formés (Bruneton 2009).

Outre les huiles végétales, on trouve chez les plantes, des cires. Ces cires sont en règle générale des hydrocarbures et des acides alcanoniques ainsi que leurs dérivés hydroxylés. Très hydrophobes, celles-ci se situent souvent à la surface de la plante (feuilles, fruits, écorce externe). Elles jouent un rôle prépondérant dans la limitation de la perte en eau, le contrôle des échanges gazeux et la protection des plantes contre les pathogènes, quand les autres lipides végétaux, comme les polysaccharides, servent plutôt de substances de réserve et de sources d'énergie cellulaire (Bruneton 2009 ; Jensen *et al.* 1963).

### **I.2.3.4. Mise en évidence et caractérisation**

Cette partie se veut être un résumé des principaux modes de mise en évidence, détection et caractérisation des produits naturels, principalement les extractibles hydrosolubles. Allant des simples tests colorimétriques établis au début du XX<sup>e</sup> siècle aux appareillages de séparation et de détection modernes, le but est de proposer des outils adaptés à différents stades d'investigation et aux différents types de composés recherchés.

#### **I.2.3.4.1. Tests de mise en évidence et de quantification spécifiques**

Avant de purifier et d'isoler les extractibles obtenus soit par un procédé nouveau, soit d'une plante inconnue ou déjà partiellement étudiée mais dont certains organes demeurent peu connus, il peut s'avérer nécessaire de s'assurer de la présence et en quelles quantités de composés recherchés. Pour cela, des tests simples, rapides et plus ou moins spécifiques ont été développés, la plupart sont basés sur la spectrophotométrie (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017), une technique plus détaillée en I.2.3.4.3.1.

### I.2.3.4.1.1. Composés phénoliques

S'il existe des tests permettant simplement la détection qualitative des composés phénoliques *e. g.* test au chlorure de fer (III), les méthodes les plus usitées sont quantitatives et donnent une estimation de la teneur en phénols totaux. Parmi elles, la référence reste la méthode de Folin–Ciocalteu (Singleton et Rossi 1965). Elle est basée sur la réduction de molybdène (VI) et de tungstène (VI) en un complexe bleu  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$  par des agents réducteurs tels que les composés phénoliques mais aussi certains sucres, acides aminés et acides organiques, *inter alia*, la vitamine C. Le manque de spécificité est donc une des principales limitations de la méthode malgré son utilisation quasi-universelle. Des méthodes alternatives existent proposant supposément une sélectivité accrue et une meilleure précision : test au bleu de Prusse, test au *fast blue* BB, toutefois leur utilisation reste encore restreinte (Lester *et al.* 2012 ; Margraf *et al.* 2015). Quelques applications de la méthode de Folin–Ciocalteu pour doser les phénols totaux d'extraits aqueux et méthanoliques de différents organes des érables rouge et à sucre sont présentés dans le **Tableau 1.1**. Ces résultats donnent une idée des fortes teneurs en composés phénoliques dans les extractibles de ces deux essences. Toutefois, ils statuent également de la variabilité entre les différentes études malgré l'uniformité de la méthode employée.

Tableau 1.1 : Teneurs en phénols totaux des extraits d'érables à sucre et rouge.

Extraits (aqueux/méthanoliques)	Phénols totaux (mg GAE/g extrait sec)	Références
Érable rouge ( <i>Acer rubrum</i> L.)	feuilles	<b>450</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a)
	tronc	<b>510</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a)
	écorce	<b>136 ; 494 ; 320</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a ; Royer <i>et al.</i> 2011 ; Tattar et Rich 1973)
	bourgeons	<b>458</b> (Meda <i>et al.</i> 2017d)
Érable à sucre ( <i>Acer saccharum</i> Marsh.)	feuilles	<b>350</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a)
	tronc	<b>440</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a)
	écorce	<b>147 ; 330 ; 170 ; (236 mg CaE/g)</b> (González-Sarrías <i>et al.</i> 2012a ; Huang et Yan 2014 ; St-Pierre, F. <i>et al.</i> 2013 ; Tattar et Rich 1973)
	bourgeons	<b>280</b> (Meda <i>et al.</i> 2017d)

Résultats obtenus par méthode de Folin–Ciocalteu. GAE, équivalents acide gallique, CaE, équivalents catéchine.

Certains tests de quantifications ont été développés pour des classes particulières de composés phénoliques. Entre autres, les tests de détermination des hydroxycinnamiques totaux (réactif nitrite/molybdate), des flavonoïdes totaux (chlorure d'aluminium (III)), ou encore des anthocyanes monomériques totaux (utilisation de solutions tamponnées) (Meda *et al.* 2017d). L'estimation des tannins au sein d'une matrice a également été largement étudiée. Pour la mise en évidence, les sels ferriques, formant

un précipité bleu-noir avec les tannins hydrolysables, offrent un bon point de départ. Plus spécifiquement les gallotannins sont colorés en rose par ajout d'iodate de potassium, les ellagitannins en rose virant au pourpre puis au bleu en milieux acides nitreux et acétique. D'autre part, les tannins condensés peuvent être précipités (brun verdâtre) par les sels ferriques ou bien colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique (Bruneton 2009). Si certains tests non spécifiques (tannins totaux) se basent sur la précipitation protéique (hémoglobine ou albumine sérique bovine), il existe des méthodes de dosage spécifique des gallotannins, par exemple, une évaluation colorimétrique de la complexation de l'acide gallique avec la rhodamine après hydrolyse en milieu acide sulfurique, ou bien des tests basés sur la réaction avec l'iodate de potassium. Selon un principe similaire, il est possible de quantifier les ellagitannins après hydrolyse et réaction avec l'acide nitreux par formation d'une quinone oxime colorée. Enfin, les tannins condensés (proanthocyanidines) sont quantifiables sous forme de monomères anthocyanidiques après hydrolyse par méthode du butanol/acide chlorhydrique ou de la vanilline acide. À noter qu'il est aussi possible de déterminer le nombre de chaînes proanthocyanidiques en associant au test précédent, un test au DMAC ou DMACA (*p*-diméthylaminocinnamaldéhyde) avec mesure par spectrophotométrie, ou bien une méthode de thiolysse combinée à un dosage en chromatographie liquide (Bruneton 2009 ; Hagerman 2002 ; Wallace et Giusti 2010). Le rapport de la quantité de proanthocyanidines totales sur le nombre de chaînes oligo- et polymériques permet d'estimer le degré de polymérisation moyen en nombre ( $DP_n$ ).

#### **I.2.3.4.1.2. Sucres**

Les glucides simples et complexes sont généralement mis en évidence et estimés par dosage des sucres totaux. Deux tests de nature similaire, au phénol-sulfurique et à l'antrone-sulfurique sont basés sur l'hydrolyse totale des oligo- et polysaccharides à chaud. La condensation avec un réactif (phénol ou antrone) des dérivés du furfural formés par l'hydrolyse produit des composés colorés : rouge foncé avec le phénol-sulfurique et bleu-vert avec l'antrone-sulfurique. Un des désavantages d'une telle méthode est le dosage des sucres simples issus des composés hétérosides qui fausse de manière plus ou moins prononcée la mesure (Cui et Brummer 2005).

Une autre approche pour estimer la quantité de sucres dans une matrice est le dosage des sucres réducteurs. Ceux-ci correspondent aux mono-, oligo- et polysaccharides dont l'unité terminale est réductrice, c'est-à-dire qu'au niveau du carbone anomérique l'hydroxyle hémiacétal est libre. Les méthodes de dosage des sucres réducteurs se basent sur des réactions d'oxydoréduction formant une espèce colorée souvent quantifiée par spectrophotométrie. Le problème de tels mécanismes est l'interférence d'autres espèces réductrices comme évoqué en I.2.3.4.1.1. (composés phénoliques, acides aminés...), des pré-traitements des échantillons à analyser sont donc parfois nécessaires (*e.g.* extraction en phase solide). Parmi les tests de sucres réducteurs totaux les plus utilisées, on trouve la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) basée sur la réduction de cet acide en milieu alcalin en un amino-nitrosalicylate coloré. Une méthode plus sensible et reproductible dénommée Cu (II)-Nc a récemment été développée, basée sur la réduction de Cu (II) en Cu (I) en présence de néocuproïne (Nc) pour former un complexe coloré (Başkan *et al.* 2016).

L'analyse de la nature des monosaccharides constitutifs des oligo- et polysaccharides se fait généralement après hydrolyse acide en utilisant des techniques chromatographiques (liquide, gazeuse) présentées par la suite en I.2.3.4.2. (Cui et Brummer 2005).

### I.2.3.4.1.3. Protéines

Une des premières approches en phytochimie pour estimer la présence de composés azotés tels que les protéines est le dosage de l'azote total, soit par analyse élémentaire après combustion de l'échantillon (méthode de Dumas) ou par la méthode de Kjeldahl basée sur la réduction de l'azote en sels d'ammonium, convertis en ammoniac avant titration. Toutefois, l'azote d'un échantillon pouvant être dû à d'autres composés (alcaloïdes, acides aminés...), des méthodes colorimétriques plus spécifiques ont vu le jour. Parmi celles-ci, la méthode BCA basée sur l'acide bicinchonique et évolution de la méthode de Lowry, ou encore la méthode de Bradford basée sur la complexation du bleu de Coomassie avec le groupement carboxylique terminal des protéines. La méthode de Bradford procure l'avantage sur les deux autres méthodes colorimétriques susnommées d'être moins sensible à l'interférence de composés réducteurs tels que les sucres (Bollag *et al.* 1996 ; Thermo Fisher Scientific 2010).

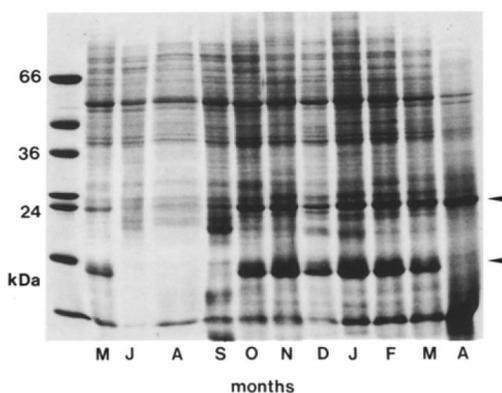


Figure I.33 : Profil protéique mensuel de l'écorce d'érable à sucre obtenu par SDS-PAGE.  
Reproduction de Wetzel *et al.* (1989) avec autorisation de Springer.

Des méthodes plus complexes permettent de détecter et quantifier spécifiquement certaines protéines (ELISA, western blot, techniques chromatographiques). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou SDS-PAGE est adaptée pour une utilisation plus générale basée sur le criblage rapide des protéines. Elle permet leur migration sélective en fonction de leur taille (masse moléculaire). Les protéines étant des espèces chargées, une fois en solution et soumises à un champ électrique celles-ci vont être capables de migrer au sein d'un gel de SDS qui les retiendra plus ou moins selon leur masse moléculaire (**Figure I.33**). Comme pour la méthode de Bradford, la mise en évidence est possible par coloration au bleu de Coomassie. La caractérisation des protéines en termes de masse peut alors se faire par comparaison à un mélange standard de protéines de masses connues ou par analyse des fractions obtenues par spectrométrie de masse (Islam *et al.* 2015 ; Weber et Osborn 1969).

L'électrophorèse ne sera pas plus détaillée par la suite compte tenu de son utilisation relativement restreinte pour d'autres molécules que les protéines. Toutefois, la spectrométrie de masse sera présentée plus en détail en I.2.3.4.3.3., étant largement utilisée en protéomique et métabolomique pour la caractérisation voire l'identification des protéines et autres métabolites des produits naturels.

#### **I.2.3.4.1.4. Saponosides**

Étant des substances tensioactives, un test très simple a été mis en place pour détecter la présence de saponosides en milieu aqueux. Le principe du test de l'indice de mousse repose sur les propriétés moussantes des saponosides en évaluant la concentration nécessaire pour maintenir une mousse persistante après agitation dans un tube à essai (1 cm après 15 min). Cette méthode reste toutefois limitée par le fait que certains bi- et tridesmosides ne produisent pas de mousse stable, tandis que d'autres composés (*e.g.* tannins, polysaccharides) sont susceptibles de mousser après agitation (Bruneton 2009).

Un autre test de mise en évidence a été développé en se basant sur les propriétés hémolytiques des saponosides *i.e.* leur capacité à lyser la membrane des hématies (globules rouges). Le test de l'hémolyse consiste à observer la décoloration ou non d'une gélose d'agar mélangé à du sang par l'extrait ou la fraction à tester comparativement à un standard. Typiquement, une fraction d'extrait d'écorce de *Quillaja saponaria* disponible commercialement et standardisée en saponosides (bisdesmosides) est généralement utilisée. Les limites d'un tel test restent similaires à celles du test de l'indice de mousse. À savoir, qu'il est possible que d'autres substances tensioactives présentes dans l'extrait à caractériser interfèrent et/ou que certains saponosides n'induisent pas d'hémolyse (Almutairi et Ali 2015 ; Bruneton 2009).

Comme pour les autres types de composés hydrosolubles présentés en I.2.3.4.1. (composés phénoliques, sucres, protéines), la mise en évidence des saponosides peut être réalisée par révélation d'une plaque de chromatographie sur couche mince à l'aide de réactifs spécifiques. Cette technique chromatographique ainsi que ces réactifs sont présentés ultérieurement dans la partie I.2.3.4.2.1.

#### **I.2.3.4.2. Techniques chromatographiques**

Les nombreux aspects de la chromatographie ont fait la preuve de leur efficacité pour détecter individuellement les extractibles, et ce, quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques (nature des atomes/fonctions, polarité, masse moléculaire, absorbance...). Ces techniques basées premièrement sur la séparation des composés peuvent se révéler capables de les quantifier de manière très précise grâce à l'association de détecteurs performants (Miller 2005). Les détecteurs les plus employés selon les types de chromatographie utilisés et de composés à détecter seront explicités dans cette partie. Toutefois, les détecteurs basés sur des techniques de caractérisation spectroscopiques classiques seront plus détaillés en I.2.3.4.3.

S'il existe plusieurs types de chromatographie, le principe de base reste le même pour les différentes techniques. Comme pour la plupart des méthodes de séparation dont l'électrophorèse évoquée en I.2.3.4.1.3., la chromatographie nécessite deux phases. La phase mobile ou éluant permet de faire migrer les composés

de l'échantillon à analyser, son état physique détermine la classe de chromatographie (gazeuse, liquide, à fluide supercritique). La phase stationnaire à l'état liquide ou solide sépare les composés élués en les retenant plus ou moins selon différents principes (adsorption, échange d'ions, exclusion stérique) présentés dans les cinq prochaines sections de cette partie.

S'intéressant spécifiquement aux extractibles hydrosolubles, la revue a choisi de commencer par présenter les outils de criblage (chromatographie sur couche mince) pour aller vers les techniques de séparation plus spécifiques de tels composés (chromatographie liquide sur colonne) et finir par des techniques basées sur d'autres principes (chromatographie à contre-courant, chromatographie gazeuse et chromatographie par fluide supercritique).

### I.2.3.4.2.1. Chromatographie plane sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) ou TLC pour *thin-layer chromatography* est largement utilisée pour le criblage ou *screening* chimique. Offrant une grande simplicité de mise en œuvre, cette technique permet d'accéder rapidement à l'information concernant la présence ou non de certains types de composés (Sarker *et al.* 2005).

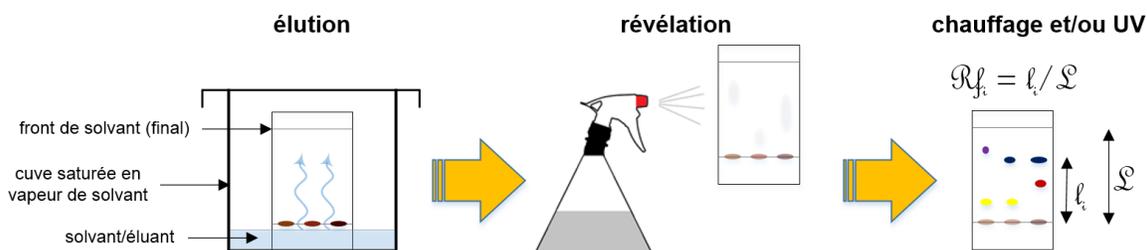


Figure I.34 : Schéma représentatif de la technique de chromatographie sur couche mince.

Le principe de cette technique plane se base sur l'utilisation d'une plaque de verre, de plastique ou d'aluminium dont la surface est constituée d'une fine couche d'un matériau plus ou moins adsorbant correspondant à la phase stationnaire. Après dépôt des échantillons au bas de la plaque, celle-ci est placée dans une cuve contenant un faible niveau de phase mobile ou éluant qui va progressivement monter par capillarité au cours de l'analyse (**Figure I.34**). Lorsque le front de solvant atteint le haut de la plaque (hauteur arbitraire), celle-ci est retirée de la cuve. Après séchage de la plaque, il est possible de révéler la présence des composés grâce aux réactifs présentés en **Tableau I.2**. L'apparition de tâches de couleurs traduit l'élué des composés qui est mesurée par le rapport frontal ( $R_f$ ) comme illustré en **Figure I.34** (Miller 2005 ; Sarker *et al.* 2005).

En CCM, il existe plusieurs types de phase stationnaire : les phases normales, polaires adsorbantes (silice, alumine) et polaires mais permettant un mécanisme de partition avec l'éluant (cellulose, silice amino, silice diol, silice cyano) ou bien les phases inverses, apolaires, également pour la partition (silice greffée  $C_8$ ,  $C_{18}$  ou par des groupements phényles). Les phases mobiles sont le plus souvent utilisées en mode isocratique. La subtilité de la CCM en phase normale ou inverse réside dans la composition de l'éluant (proportion de

solvant polaire/apolaire) selon la nature des composés à séparer, des exemples sont présentés dans le **Tableau I.2**. À noter que pour les éluants de systèmes en phase normale, le solvant de base apolaire est modifié par ajout d'un plus polaire et généralement d'un faible pourcentage d'acide pour améliorer la résolution des taches (Miller 2005 ; Sarker *et al.* 2005). La séparation des différents types de composés, plus ou moins précise selon le choix de la phase stationnaire et l'optimisation de la phase mobile procure un avantage comparé aux méthodes de quantification basées sur la colorimétrie, présentées en I.2.3.4.1. En effet, grâce à la CCM, il est possible d'avoir déjà une idée du nombre et des quantités relatives des composés extractibles grâce à l'intensité de la coloration après révélation. Ces informations sont très utiles dans le domaine de la chimimétrie où l'on remplace l'œil humain par des outils mathématiques et statistiques pour mettre en évidence les différences et similitudes de plusieurs profils métaboliques (*fingerprints*) e.g. *fingerprinting* par CCM des bourgeons d'érable rouge et à sucre (Meda *et al.* 2017c). De telles applications sont grandement facilitées par les appareillages modernes de type Camag *automatic TLC sampler* permettant des dépôts et migrations uniformes pour des analyses en routine.

*Tableau I.2 : Exemples de phases mobiles associées à une phase stationnaire silice pour la migration de composés spécifiques des érables et réactifs de révélation. (Meda 2018 ; Meda et al. 2017c)*

Composés	Phase mobiles	Réactifs de révélation/dérivation
apolaires ex : terpènes	hexane/acétate d'éthyle (7/3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>anisaldéhyde sulfurique (<math>\approx 100^\circ\text{C}/\text{visible}</math>) : terpènes alcooliques (couleurs variées)</li> <li>acide phosphomolybdique (visible) : huiles essentielles (bleu)</li> <li>réactif de Dragendorff (visible) : alcaloïdes (orange) (McSweeney 1965 ; Pascual <i>et al.</i> 2002)</li> </ul>
polarité intermédiaire ex : saponosides peu glycosylés	dichlorométhane/ méthanol (8/2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>réactif de Liebermann–Burchard (UV/visible) : saponosides triterpéniques (rose-rouge), saponosides stéroïdiques (bleu-vert) (Bruneton 2009 ; Narayanan et Seshadri 1969 ; Pascual <i>et al.</i> 2002)</li> </ul>
polarité intermédiaire ex : composés phénoliques	acétate d'éthyle/ acide acétique/ méthanol (10/1/1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>réactif de Neu (UV) : flavonoïdes (jaune à orange), hydroxycinnamiques (bleu, vert blanchâtres), dérivés galliques (bleu foncé)</li> <li>hydroxyde de potassium (UV/visible) : coumarines (bleu, bleu-vert, jaune-vert), anthraquinones (rouge)</li> <li>vanilline-HCl (UV) : proanthocyanidines (rouge)</li> <li>DPPH : antioxydants en général (taches jaune clair sur fond violet foncé) (Andary <i>et al.</i> 1996 ; Pascual <i>et al.</i> 2002 ; Sarker <i>et al.</i> 2005)</li> </ul>
très polaires ex : sucres, protéines, saponosides très glycosylés	<i>n</i> -butanol/acide acétique/méthanol (6/3/1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>anisaldéhyde ou vanilline sulfurique (<math>\approx 100^\circ\text{C}/\text{visible}</math>) : saponosides (très colorés), protéines, sucres</li> <li><math>\alpha</math>-naphthol ou orcinol sulfurique (<math>\approx 100^\circ\text{C}/\text{visible}</math>) : sucres (violet foncé à bleu foncé) (Bruneton 2009 ; Santana et Meireles 2016)</li> </ul>

#### I.2.3.4.2.2. Chromatographie liquide sur colonne

La technique de chromatographie liquide utilisant une colonne repose sur des principes similaires à ceux de la CCM. Malgré son invention remontant au début du XX<sup>e</sup> cette méthode est encore très pertinente

en particulier pour la séparation de métabolites de produits naturels. Ceci est en grande partie dû à la constante évolution de la méthode en parallèle des progrès scientifiques et techniques réalisés depuis le siècle dernier. La référence étant la chromatographie liquide haute performance, le plus souvent désignée par l'acronyme HPLC (*high performance liquid chromatography*) qui demeure depuis quelques décennies la référence dans beaucoup de laboratoires de chimie analytique pour, entre autres, sa précision, répétabilité, versatilité et simplicité d'utilisation (Miller 2005).

### ***Phase inverse***

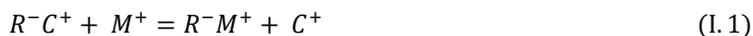
Pour classifier les types d'HPLC et de chromatographie liquide en général, on peut se baser sur les différentes sortes de colonnes correspondant à des phases stationnaires particulières. La chromatographie en phase inverse est la plus utilisée (RP-LC). Avec une phase stationnaire apolaire de silice, souvent greffée C<sub>18</sub> voire C<sub>8</sub>, elle se base sur le partage des métabolites avec la phase mobile polaire. La migration se fait donc dépendamment de la polarité des solutés. Cette technique est adaptée pour la plupart des extractibles puisqu'il est possible d'ajuster la polarité de la phase mobile par l'emploi de plusieurs solvants (*e.g.* eau, méthanol, acétonitrile) selon de multiples gradients d'élution. Des variantes existent comme la chromatographie à interactions hydrophobes (HIC) qui permet la séparation spécifique de protéines hydrophobes. Suite à une élution par un tampon aqueux concentré en sels, celles-ci se fixent sur la phase stationnaire (*e.g.* Sepharose phénylé). Dans un second temps, par réduction de cette concentration selon un gradient, l'interaction s'inverse et les protéines sont éluées des moins hydrophobes aux plus hydrophobes (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2006 ; Harvey 2000 ; Sarker *et al.* 2005).

### ***Phase normale***

Selon un principe diamétralement opposé à la chromatographie en phase inverse, la chromatographie en phase normale (NP-LC) met en jeu une phase stationnaire de silice voire silice greffé de groupes fonctionnels polaires (cyano, diol, amino). La phase mobile apolaire peut être constituée de mélanges d'hydrocarbures aliphatiques (*n*-hexane), halogénés (dichlorométhane), oxygénés (acétate d'éthyle) voire de solvants hydroxylés (méthanol). Ainsi les composés à séparer sont souvent hydrophobes (longues chaînes aliphatiques, terpènes). Il existe néanmoins une variante de la NP-LC adaptée à l'élution de composés polaires sur une phase stationnaire polaire (silice, amino, cyano, dérivés de polysuccinimide) : la chromatographie à interactions hydrophiles ou HILIC. Le principe de cette technique utilisant une phase mobile également polaire est basé sur de multiples interactions (interactions polaires et ioniques dominant les phénomènes de partition). À l'inverse de la RP-LC, l'élution commence avec un solvant organique de faible polarité, l'augmentation de la proportion d'eau dans la phase diminue progressivement la rétention et permet aux composés de sortir. Cette méthode est efficace pour l'analyse de saccharides, peptides et autres composés polaires organiques ou inorganiques, de préférence neutres (Bell 2013 ; Buszewski et Noga 2012 ; Miller 2005 ; Sarker *et al.* 2005).

### *Échange d'ions*

Pour certains composés chargés tels que les protéines, l'HILIC peut être insuffisante à permettre une bonne séparation. Une technique basée sur la rétention électrostatique est généralement privilégiée, la chromatographie à échange d'ions (IEC). Son principe repose sur l'échange des extractibles chargés dans la phase mobile (eau tamponnée) avec les ions ayant une affinité avec la résine de la phase stationnaire. Dans le cas présenté ci-après, la résine ( $R$ ) possède des sites (groupements fonctionnels) anioniques ( $^-$ ), des cations ( $C^+$ ) et des métabolites chargés positivement ( $M^+$ ) sont donc échangés, on parle de chromatographie à échange de cations (*Eq I.1*).



À l'opposé, une phase stationnaire possédant des sites cationiques permettra une chromatographie à échange d'anions. Dans les deux cas, l'ion couplé à la résine ne doit pas y être trop retenu pour permettre l'échange, il est également nécessaire qu'il soit présent dans la phase mobile – c'est en faisant varier sa concentration qu'il est possible de jouer sur l'échange d'ions et donc la rétention des métabolites à analyser (Miller 2005). La résine employée en tant que phase stationnaire peut aussi bien être hydrophobe qu'hydrophile *e.g.* copolymère styrène-divinylbenzène, polysaccharides (Sephadex, un dextrane réticulé commercial), silice. Les groupes fonctionnels qui y sont greffés servent à l'échange d'ions. Pour l'échange d'anions on peut privilégier une amine tertiaire (anions faibles) ou un ammonium quaternaire (anions forts), tandis que pour l'échange de cations, un acide carboxylique est adapté aux cations faibles et les acides sulfonique et phosphorique aux cations forts (Harvey 2000 ; Sarker *et al.* 2005).

### *Exclusion stérique*

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est basée sur la séparation des composés en fonction de leur taille. Il existe deux principales dénominations, la chromatographie par filtration sur gel (GFC) lorsque la phase mobile est aqueuse et la chromatographie par gel perméable (GPC) pour toute autre phase mobile, le solvant le plus utilisé étant le THF. Les phases stationnaires sont généralement des dérivés de silice, des copolymères de styrène, des polyacrylamides réticulés ou encore à base de Sephadex. Le principe de la SEC est résumé en *Figure I.35*. La phase stationnaire est un gel constitué de particules mésoporeuses de différentes dimensions selon la sélectivité de la colonne (gamme de masse moléculaire) dans lesquelles les métabolites à analyser vont pouvoir pénétrer et être temporairement retenues. Des métabolites polymères de masses trop importantes (au-delà de la limite d'exclusion), ne pouvant pas pénétrer les plus gros pores, ne sont pas retenus et élués indifféremment. À partir de cette limite d'exclusion, la décroissance des tailles des macromolécules en solution va leur permettre de pénétrer un nombre croissant de pores et donc augmenter les temps de rétention. À partir d'une certaine masse moléculaire, les métabolites sont à même d'être retenus par toutes les dimensions de pores et sont donc éluées simultanément.

Cette représentation est théorique étant donné les différences de comportement des chaînes polymères dans un solvant donné. En effet, ce sont leur volume hydrodynamique et rayon de giration qui vont conditionner la perméation des chaînes polymères au sein du gel poreux, mais ces deux valeurs ne

permettent pas toujours de déterminer avec précision la masse moléculaire. L'usage d'une courbe de calibration basée sur un standard universel (polystyrène, PEG/PEO, dextrans) donne donc une estimation de la masse moléculaire, une détection par spectrométrie de masse peut alors s'avérer utile selon le degré de précision requis. La SEC est assez largement utilisée pour l'analyse de biopolymères tels que des protéines, des polysaccharides, des tannins voire des lignines. À noter qu'il est courant d'analyser de telles métabolites en mettant en série plusieurs colonnes de sélectivités différentes dans le but d'améliorer la séparation (meilleure résolution) et son étendue (plus large gamme de masses moléculaires).

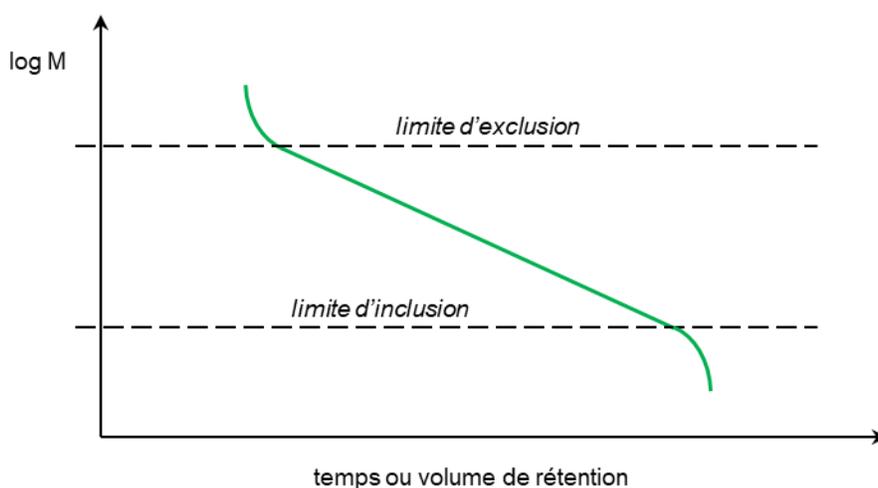


Figure I.35 : Principe de l'exclusion stérique. Courbe de calibration pour déterminer la masse moléculaire ( $M$ ) des composés en fonction de leur rétention.

### **Les échelles de colonnes**

Dépendant du stade d'avancement de la séparation des produits naturels d'un extrait (de l'analyse de l'extrait brut complexe à la purification de composés isolés), plusieurs échelles de colonnes sont disponibles pour les différents types de chromatographie présentés précédemment.

Les colonnes de dimensions et de tailles de pores les plus faibles sont celles utilisées en UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*), une technique de chromatographie liquide sous très haute pression développée au cours de la dernière décennie. Cette pression (jusqu'à 1 300 bar) permet des temps de rétention et donc d'analyse très courts. La bonne résolution des pics de composés dans les chromatogrammes d'UHPLC est assurée par des particules dans la colonne, inférieures à 2  $\mu\text{m}$ . L'UHPLC est donc idéale pour séparer rapidement des mélanges complexes. Le couplage avec la spectrométrie de masse, UHPLC-MS voire UHPLC-MS/MS est très utile pour la dérégulation que ce soit en biologie médico-légale (analyses d'ADN, d'urine) ou en phytochimie pour la caractérisation de métabolites basée sur des données chimiotaxonomiques (Guillarme et Veuthey 2012 ; Sarker *et al.* 2005). Malgré le développement récent de l'UHPLC, l'HPLC reste le standard actuel en laboratoire. La pression d'utilisation (< 400 bar), et les dimensions de particules (3,5–5  $\mu\text{m}$ ) et de colonne (standard : 4,6 mm  $\times$  250 mm contre 1–3 mm  $\times$  100 mm en UHPLC) induisent des temps d'analyses plus longs et une résolution des pics de composés inférieure mais une séparation satisfaisante si l'échantillon à analyser n'est pas trop complexe (*e.g.* fraction d'un

extrait). Une distinction peut être faite entre HPLC analytique avec laquelle il est possible de collecter des échantillons après séparation mais en très faibles quantités (souvent trop peu pour une caractérisation spectroscopique par RMN) et l'HPLC semi-préparative. La semi-préparative est un outil adapté pour répondre à ces limitations. Alors que les débits d'élution classique en HPLC analytique dépassent rarement 1 mL/min, ceux utilisés en semi-préparative sont plus souvent de l'ordre d'une voire plusieurs dizaines de mL/min. Les dimensions de colonne et de particules sont également supérieures (8–16 mm × 250 mm, 5–10 µm). On parle d'HPLC préparative à échelle encore supérieure dans le but d'une production industrielle. Les colonnes préparatives et semi-préparatives sont généralement indiquées pour purifier un composé déjà concentré et assez isolé au sein d'une fraction (Harvey 2000 ; Miller 2005 ; Sarker *et al.* 2005).

Pour mettre en œuvre la séparation de grandes quantités d'extraits ou de fractions dans le but de produire des extractibles isolés en quantité, il existe d'autres types de colonnes utilisées à plus faibles pressions. La chromatographie flash permet le fractionnement rapide d'un mélange. Les appareillages modernes laissent à l'utilisateur la possibilité de modifier en direct le gradient de solvant et d'adapter les options de collecte en fonction des informations fournies par le chromatogramme en cours d'acquisition. Pour une utilisation similaire et des quantités encore supérieures on peut réaliser une chromatographie sur colonne sous pression modérée (MPLC, *medium pressure chromatography*) utilisée pour réduire la matrice ou extrait de base en fractions concentrant des groupes de composés d'intérêt. Les phases stationnaires les plus employées étant à base de silice, de Sephadex (séparation en fonction de la taille) ou de résines Amberlite XAD (pour séparer les composés aromatiques des autres extractibles) (Miller 2005 ; Sarker *et al.* 2005).

### ***Les détecteurs***

Le type de détection principal pour la chromatographie liquide est le DAD ou PDA (*diode array detector, photodiode array detector*), qui permet de détecter quantitativement à une seule ou à de multiples longueurs d'ondes les composés élués absorbant dans l'ultraviolet (UV) ou le visible (Vis), comme c'est le cas pour les composés aromatiques (phénoliques). Toutefois, lorsqu'on s'intéresse à des composés n'absorbant pas en UV/Vis (sucres, protéines ou saponosides), d'autres types de détection sont à envisager. La SEC utilise souvent la détection par indice de réfraction (RI) qui nécessite une élution isocratique donc moins utilisable en HPLC classique, mais aussi la détection par diffusion de la lumière (ELSD ou *evaporative light scattering detector*), prisée en chromatographie flash. À noter que ce détecteur est destructif, la collecte en flash s'effectue donc généralement en parallèle de la détection. C'est également le cas de la détection par spectrométrie de masse (MS) qui, étant universelle, renseigne sur la masse des métabolites et de leurs fragments. Lorsqu'elle est couplée à la chromatographie liquide on parle de LC-MS. La spectrométrie de masse en tant que technique de caractérisation sera plus détaillée en I.2.3.4.3.3. La LC-NMR (résonance magnétique nucléaire) est un exemple de technique couplée non-destructive pour caractériser les extractibles élués, ce type de détection spectroscopique est détaillé en I.2.3.4.3.4. Autre type de détection, la détection électrochimique (ampérométrie, voltamétrie, coulométrie, conductimétrie), très sensible peut être employée pour analyser des glucides ou des espèces ioniques telles que les protéines. Enfin, il existe des détecteurs à fluorescence et à chimioluminescence nécessitant l'ajout d'un réactif pour détecter les métabolites, une sonde

fluorescente telle que la fluorescéine dans le premier cas et le plus souvent le luminol pour la chimioluminescence (Harvey 2000 ; Miller 2005 ; Qi *et al.* 2016 ; Sarker *et al.* 2005).

### I.2.3.4.2.3. Autres techniques

Basées sur des types de détection similaires, il existe d'autres techniques chromatographiques outre la LC utilisées pour la séparation et l'analyse des produits naturels.

#### *Chromatographie à contre-courant*

La chromatographie liquide à contre-courant (CCC) et dans une plus grande mesure sa déclinaison la plus avancée, la HSCCC pour *high speed countercurrent*, est une alternative à la chromatographie liquide sur colonne. À noter que le terme « contre-courant » ne signifie pas nécessairement que les deux phases liquides immiscibles sur lesquelles repose la technique migrent dans des directions opposées. Le principe de l'HSCCC repose sur deux axes de rotation. Un tube généralement en fluoropolymère (Teflon®, Tefzel®) est enroulé pour former une bobine. Cette bobine, en rotation sur elle-même (axe de rotation), est dans le même temps centrifugée selon un autre axe (axe de révolution) comme décrit en **Figure I.36**.

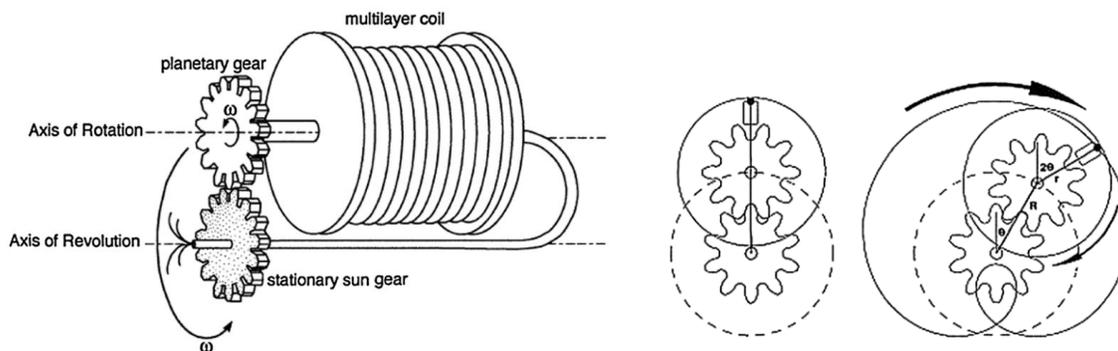


Figure I.36 : Principe de centrifugation utilisé pour accélérer la séparation en chromatographie à contre-courant. Reproduction de Skalicka-Woźniak et Garrard (2014) libre de droits.

Cette double rotation induit la migration des deux phases (stationnaire, déjà présente dans la bobine et mobile, injectée en tant que solvant de l'échantillon). Au sein de chacune des spires de la bobine, la migration s'effectue sous la forme d'une zone de mélange (*mixing*) lors des faibles accélérations et d'une zone de décantation (*settling*) lors des fortes accélérations. La séparation des composés se fait progressivement selon leurs solubilités respectives dans les deux phases. Chacune pouvant être composée de plusieurs solvants, la méthode est personnalisable pour pratiquement tout type de métabolites (*e.g.* terpènes, saponosides, composés phénoliques, peptides, glycolipides) (Friesen *et al.* 2015 ; Sarker *et al.* 2005 ; Skalicka-Woźniak et Garrard 2014). La séparation et le fractionnement des composés phénoliques par chromatographie à contre-courant est d'ailleurs en pleine expansion depuis le début du siècle, en grande partie dû à la grande flexibilité et au caractère *scalable* de la technique par rapport aux autres outils chromatographiques (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017).

### ***Chromatographie gazeuse***

En règle générale, la chromatographie gazeuse (GC) est plutôt adaptée pour les composés volatils apolaires tels que les monoterpènes des huiles essentielles (Francezon et Stevanovic 2017a). Le principe repose sur l'élution sous forme gazeuse de métabolites volatils par un gaz vecteur comme phase mobile (hélium, argon, diazote) selon un gradient de température. Dans les colonnes capillaires (*open tubular*) ou remplies (*packed*), la phase stationnaire est généralement composée de dérivés siloxanes ou de PEG. La détection se fait la plupart du temps par ionisation de flamme (FID) ou par conductivité thermique (TCD). Toutefois comme pour la LC, la GC peut être couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS ou GC-MS/MS). Malgré cette prépondérance des composés apolaires et donc hydrophobes en GC, cette technique peut s'avérer utile pour certains extractibles hydrosolubles. Suite à une étape de dérivation les rendant volatils (*e.g.* silylation), il est possible de déterminer la nature de sucres, d'alcools ou d'acides aminés simples. Selon un autre principe, il est possible de pyrolyser des échantillons contenant des tannins condensés avant injection en GC-MS (*Py-GC-MS*) pour ainsi en déterminer les unités constitutives (Harvey 2000 ; Sarker *et al.* 2005).

### ***Chromatographie à fluide supercritique***

La chromatographie à fluide supercritique (SFC) est une alternative plus économique et écologique à la GC pour la séparation de composés thermosensibles peu polaires (hydrophobes). Elle se base sur une phase mobile généralement composée de dioxyde de carbone et d'un co-solvant éthanolique ou méthanolique en proportions adaptables par gradient. Le caractère supercritique de cette phase lui confère des propriétés physiques intermédiaires aux liquides et aux gaz. En SFC, le coefficient de diffusion et la densité du fluide sont inférieurs mais proches des conditions de la LC tandis que la viscosité est à peine supérieure à celle d'un gaz de GC. Comme en GC, la séparation de produits naturels peut se faire en colonnes capillaires ou remplies. Ainsi, la SFC a été utilisée avec succès pour la séparation et la purification de terpènes, d'alcaloïdes mais aussi de certains flavonoïdes et peptides linéaires (Miller 2005 ; Webster 2014).

#### **I.2.3.4.3. Techniques spectroscopiques de caractérisation**

Comme précédemment évoqué, la spectroscopie (ou spectrométrie) est à l'origine de certains détecteurs utilisés en chromatographie (DAD, MS...). Basée sur les interactions entre matière et rayonnement électromagnétique *i.e.* lumière, ce domaine d'étude de la physique et de la chimie se décline en plusieurs techniques très utilisées pour caractériser atomes, molécules organiques ou structures inorganiques (Harvey 2000).

##### **I.2.3.4.3.1. Spectroscopie ultraviolet/visible**

Comme les autres types de spectroscopie photonique, la mesure est basée sur l'absorption de photons dans une certaine région du spectre électromagnétique, dans ce cas l'ultraviolet ou UV (100–400 nm) et le visible, Vis (400–750 nm). Les tests colorimétriques évoqués en I.2.3.4.1. se basent sur ce domaine de la

spectroscopie. La mesure de l'absorbance de la solution étudiée peut être reliée à la concentration de l'analyte à doser par la loi de Beer-Lambert, dont on présente généralement une relation linéaire (expression dérivée) valable à une longueur d'onde donnée (Eq I.2) :

$$A = \varepsilon \times b \times C \quad (I.2)$$

avec  $A$ , l'absorbance (sans unité),  $\varepsilon$ , l'absorptivité molaire ou coefficient d'extinction molaire ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) qui dépend de la longueur d'onde de mesure, de la nature chimique de l'analyte et de la température,  $b$ , la longueur du trajet optique dans la solution (cm) et  $C$ , la concentration de l'analyte dans la solution ( $mol \cdot L^{-1}$ ). À noter que la linéarité de loi de Beer-Lambert n'est valable que sur un domaine restreint *i.e.* pour des concentrations d'analyte relativement faibles (Harvey 2000).

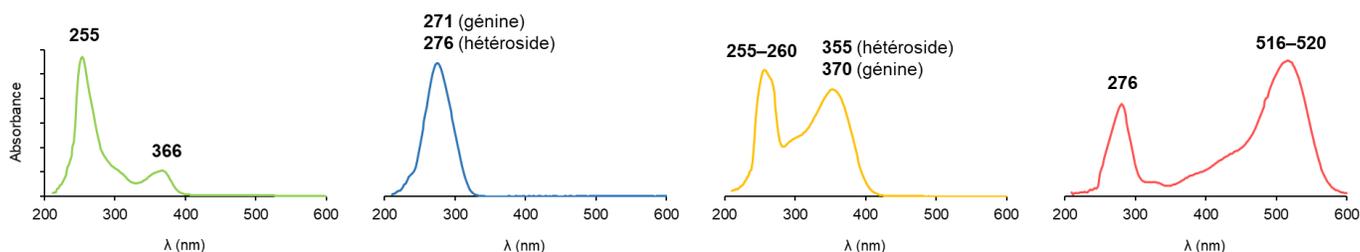


Figure I.37 : Spectres et maxima d'absorption UV/Vis caractéristiques de (gauche à droite) l'acide ellagique, des acides-phénols, des flavonoïdes et des anthocyanes.

Outre l'application quantitative de la spectroscopie UV/Vis en colorimétrie, cette technique offre une approche qualitative très intéressante pour la caractérisation des produits naturels. En effet, un balayage en longueur d'onde permet de fournir un spectre généralement caractéristique d'un composé ou d'une famille de composés, de par ses maxima d'absorption et son allure, la limite étant que ces composés doivent être chromophores et donc absorber dans le domaine UV/Vis. C'est le cas par exemple des composés phénoliques montrant différentes valeurs de maximum possibles (anthocyanes, 520 nm ; flavonoïdes et coumarines, 350 nm ; hydroxycinnamiques, 320 nm ; acides-phénols et autres, 280 nm) mais pas des saccharides (Harvey 2000 ; Sarker *et al.* 2005). On peut citer l'acide ellagique, dilactone dérivé d'acide hydroxybenzoïque au spectre très caractéristique permettant une identification quasi-instantanée (Figure I.37).

#### I.2.3.4.3.2. Spectroscopie de masse

La spectroscopie ou spectrométrie de masse (MS) est un outil devenu pratiquement indispensable pour l'analyse structurale des produits naturels. Bien qu'étant une technique destructive, elle est sensible, rapide, généralement automatisée et permet l'analyse de métabolites en faibles concentration et contenus dans des mélanges complexes. Tel qu'explicité en I.2.3.4.2., la MS est souvent couplée à des techniques de séparations chromatographiques (Sarker *et al.* 2005). Les différents composants d'un appareil de MS sont résumés en Figure I.38.

Brièvement, après injection de l'échantillon (directe ou après séparation), celui-ci est ionisé par différents procédés (ESI, APCI, MALDI...). Les ions gazeux sont alors séparés et regroupés selon leur ratio masse/charge ( $m/z$ ), avant d'être détectés généralement à l'aide d'un multiplicateur d'électrons (détecteur le

plus utilisé) qui amplifie le signal mesuré par la formation d'électrons. En termes de caractérisation, les données obtenues par MS renseignent sur les  $m/z$  de composés analysés et les abondances isotopiques. Leur traitement peut conduire à la détermination de formules brutes et de masses exactes (cas d'une analyse Q/TOF), mais également fournir des indices structuraux grâce à l'analyse des fragments (connexions intramoléculaires des atomes). La fragmentation permet l'étude des filiations ioniques qui donnent de nombreuses informations sur la structure des molécules. Elle est induite pour les espèces ioniques stables par l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS *i.e.* MS<sup>2</sup> voire MS<sup>n</sup>). Comme en MS classique, le mode tandem MS/MS implique une source d'ionisation (capable de fragmenter uniquement les ions instables) et un analyseur. Toutefois, ce mode ajoute une cellule de collision pour fragmenter les ions stables (*i.e.* ions parents) en ions fils (*i.e.* ions produits) avant la séparation par un deuxième analyseur et la détection. Cette détection peut s'effectuer selon trois modes :

- Le « scan des ions produits » pour lequel seuls certains ions parents d'un certain  $m/z$  sont isolés. Après dissociation de ceux-ci, tous les ions produits sont scannés et détectés.
- Le « scan des ions parents » utile pour le criblage de certains types de composés (*e.g.* glycosides, tannins). Un ion fils est ciblé puis il s'agit de scanner les ions parents donnant cet ion fils précis.
- Enfin, le « scan de perte neutre » qui est également utilisé pour le criblage. Dans ce cas, les deux MS peuvent être scannés pour mettre en évidence la perte d'un fragment neutre caractéristique d'un composé ou groupe de composés recherchés.

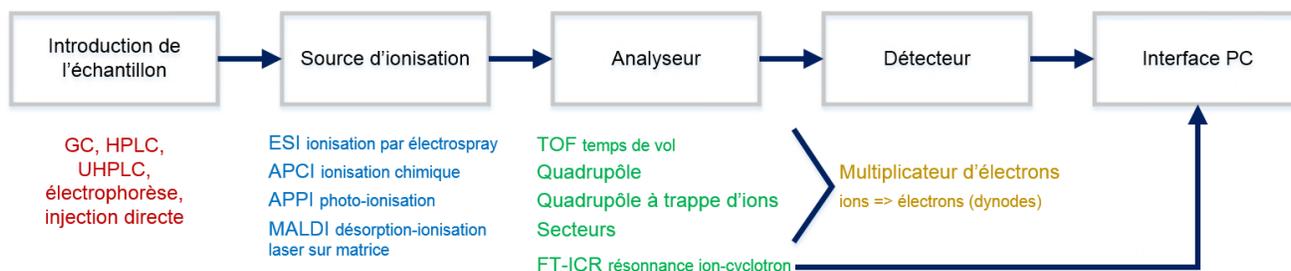


Figure I.38 : Principe d'un appareillage standard de spectrométrie de masse.

S'il existe plusieurs types de cellules de collision, avec une surface (SID), un gaz (CID) ou impliquant l'absorption des photons d'un laser (IRMPD), il est aussi possible de faire de la MS/MS tandem « dans l'espace » ou « dans le temps ». Le mode tandem dans l'espace est basé sur un premier analyseur quadrupôle (Q), soit pour le scan d'ions parents et de perte neutre en mode Q-q-Q (MS/CID/MS), la cellule de collision étant un autre quadrupôle (q), soit uniquement pour le scan d'ions fils (plus rapide), en Q/TOF. Mettant en jeu des instruments à trappe (quadrupôle à trappe ionique ou FT-ICR), le mode tandem dans le temps permet des scans d'ions parents ou de perte neutre plus efficaces car il est alors possible d'effectuer de multiples étapes de MS/MS (MS<sup>n</sup>) avec un seul analyseur (Glish et Vachet 2003).

Comme évoqué lors de la présentation des tests de mise en évidence des protéines (I.2.3.4.1.3.), la spectrométrie de masse, en particulier en mode tandem est un outil prépondérant en protéomique et métabolomique. Par exemple, basé sur des traitements statistiques, le *networking* est une approche s'intéressant à la détermination des relations structure/activité des protéines/métabolites. Ces relations sont

accessibles suite à des comparaisons entre des fichiers de données très denses (spectres MS) et des bases de données existantes (Olivon *et al.* 2017).

#### **I.2.3.4.3.3. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire**

Également intéressante pour la métabolomique (*fingerprinting*), la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire ou RMN est l'outil ultime d'identification et de confirmation des structures de composés purifiés. Son principe se base sur l'excitation par des radiofréquences d'atomes soumis à un champ magnétique. Dépendamment du spin initial des noyaux atomiques et de leurs interactions avec les atomes et liaisons chimiques voisines, un appareil de spectroscopie RMN calcule des déplacements chimiques ( $\delta$ ) basés sur la mesure de la fréquence de résonance des noyaux et exprimés en ppm. Cette technique se révèle donc particulièrement utile en phytochimie pour mettre en évidence des groupements organiques typiques (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, OH, phényles...), et surtout leurs positions, orientations, et couplages respectifs. L'information obtenue grâce à des spectres RMN est plus substantielle et significative que celle obtenue par toute autre technique spectroscopique. S'il existe la RMN du solide utilisé en sciences des matériaux, la RMN en solution demeure la plus employée pour la chimie des produits naturels. La RMN du proton <sup>1</sup>H et celle du carbone <sup>13</sup>C sont généralement utilisées en première approche et peuvent suffire à la confirmation d'une structure simple. Toutefois, les renseignements concernant le couplage des hydrogènes en <sup>1</sup>H peuvent se révéler insuffisant pour l'identification de nouvelles molécules complexes. Dans ce cas, on a recours à des dispositifs de RMN bidimensionnelle (2D) qui permettent de mieux appréhender les couplages et relations entre atomes et liaisons voisines, à l'aide de méthodes corrélatives. Ces méthodes de RMN 2D mettent en jeu l'application de séquences d'impulsions pour l'observation de couplages spécifiques au sein de la molécule inconnue (Ning 2011 ; Sarker *et al.* 2005). Quelques exemples de RMN 2D les plus utilisées sont présentés en **Tableau I.3**. Si ces techniques corrélatives sont bien adaptées pour tous les types de composés organiques, il est intéressant de mentionner l'intérêt de la TOCSY pour des polymères tels que les oligo- et polysaccharides.

Outre les techniques basées sur le proton et le carbone, d'autres noyaux peuvent être utilisés en RMN liquide (<sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, <sup>29</sup>Si, <sup>6</sup>Li, <sup>7</sup>Li, <sup>15</sup>N, ou encore <sup>11</sup>B). La RMN du phosphore <sup>31</sup>P est particulièrement utile pour des analyses de quantification. On peut citer l'exemple de la lignine dont il est possible de phosphoryler les H labiles et ainsi de quantifier les groupements hydroxyles et acides carboxyliques de différentes natures (Condassamy 2015).

#### **I.2.3.5. Bioactivités des extractibles**

Si la connaissance des structures chimiques des produits naturels reste prépondérante dans les domaines de la chimiotaxonomie et de la métabolomique, la mise en évidence de bioactivités demeure un axe central de la phytochimie. Dans le cadre de ces disciplines, la recherche sur les produits naturels peut être abordée selon différentes stratégies. Les approches les plus traditionnelles consistent à se focaliser sur les composés. On sélectionne des tissus organiques utilisés en ethnopharmacologie pour en isoler les

composés. Utiles pour améliorer les connaissances taxonomiques, ces composés purs peuvent aussi être testés pour la mise en évidence d'éventuelles activités biologiques. Les approches modernes sont nettement plus axées sur les bioactivités. La production de grandes banques d'extraits et de fractions associée au développement de concepts novateurs (métabolomique, protéomique, déréduplication, *fingerprinting*, criblage à haut débit ou HTS, approches *in silico*) permettent de systématiser le criblage de composés bioactifs en fonction des activités recherchées (Rostagno et Prado 2013 ; Sarker *et al.* 2005). Quelle que soit la stratégie, la recherche de bioactivités commence *in vitro*. Les tests chimiques de piégeage de radicaux constituent généralement la première approche et permettent de mettre en évidence des effets réducteurs regroupés sous l'appellation activité antioxydante.

Tableau I.3 : Exemples de méthodes corrélatives de RMN 2D usuelles.  
(Ning 2011)

Méthode et variantes	Couplage
<i>Homonuclear shift correlation spectroscopy</i>	H,H-COSY TOCSY INADEQUATE
<i>Heteronuclear shift correlation spectroscopy</i>	H,C-COSY HSQC HMQC
<i>Low-range heteronuclear shift correlation spectroscopy</i>	HMBC
<i>Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy</i>	NOESY ROESY

### I.2.3.5.1. Activité antioxydante

En tant que point de départ pour évaluer le potentiel bioactif, l'activité antioxydante d'extraits et de composés se définit comme leur capacité à faibles concentrations à retarder ou empêcher l'oxydation par des espèces réactives d'un tiers (substrat). L'engouement pour les antioxydants vient de l'implication de substances réactives oxygénées (ROS) ou azotées (RNS), principalement radicalaires, dans les mécanismes de l'oxydation chez les êtres vivants et l'humain en particulier. En effet, un excès de ces substances *i.e.* stress oxydatif peut causer des dommages irréversibles d'oxydation de lipides et de protéines essentielles, voire même de l'ADN menant à des risques accrus de maladies cardiovasculaires, cancers ou autres maladies dégénératives (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017 ; Foti 2007 ; Friaa et Brault 2006 ; Khemani *et al.* 2012).

#### I.2.3.5.1.1. Mécanismes

Les antioxydants peuvent être secondaires ou préventifs lorsqu'ils inhibent la réaction de Fenton correspondant à la formation de métaux de transitions oxydants. C'est aussi le cas lorsqu'ils induisent un effet synergique en présence d'autres antioxydants. On parle d'antioxydants primaires, donneurs ou à rupture

de chaînes (*chain-breaking*) lorsque ceux-ci stabilisent directement les ROS ou RNS en les « piégeant » (*radical scavenging*) (Co 2010 ; Foti 2007). Le piégeage de radicaux s'articule autour de deux mécanismes principaux, le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT) ou celui d'un ou plusieurs électrons (SET), respectivement décrits en *Eq I.3* et *Eq I.4*.



Le mécanisme HAT a récemment été explicité dans le cas du transfert de H entre deux hétéroatomes. Dans ce cas, comme par exemple pour la réaction d'un antioxydant phénolique ArOH sur un radical peroxyyle ROO<sup>•</sup> (*Eq I.5*), on parle de « transfert de proton couplé et d'électron » ou PCET (*proton-coupled electron transfer*). Il implique l'établissement préalable d'un complexe entre le phénol ArOH (–H) et le radical ROO<sup>•</sup> (doublet non liant du O terminal). Alors que l'atome d'hydrogène est transféré au radical, un électron est également transféré depuis un doublet non liant du phénol vers l'orbitale (SOMO) contenant l'électron non apparié du radical (Foti 2007 ; Ingold et Pratt 2014). À noter que les antioxydants phénoliques tendent à s'ioniser partiellement en anions phénoxydes ArO<sup>–</sup> lors de réactions de piégeage de radicaux (R<sup>•</sup>) en solvants protiques (eau, alcools). Il en résulte un mécanisme de transfert séquentiel baptisé SPLET (*sequential proton-loss electron transfer*), la perte d'un proton du phénol précède le transfert d'électron vers le radical (*Eq I.6*) (Craft *et al.* 2012 ; Foti *et al.* 2004 ; Friaa et Brault 2006 ; Ingold et Pratt 2014).

### I.2.3.5.1.2. Tests

Des tests *in vitro* rapides ont été développés pour mettre en évidence des comportements antioxydants sous la forme de piégeage de radicaux (*Tableau I.4*). La mesure proposée par ces tests peut être qualifiée par plusieurs appellations. La capacité antioxydante évalue la réaction complète de réduction ou de piégeage des radicaux au bout d'une certaine durée d'incubation standardisée. Bien qu'ayant une certaine valeur au sens chimique, la capacité antioxydante nécessite un temps pour la réaction totale des composés inférieur à la durée d'incubation, pour être comparable. L'aspect cinétique de la réaction, considéré par certains comme le premier critère pour classer les antioxydants, n'est pas pris en compte lors de la mesure de la capacité antioxydante. D'autres méthodes évaluent donc à la place l'activité antioxydante en testant plusieurs concentrations pour déterminer la concentration efficace médiane (EC<sub>50</sub>) ou concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>). Toutefois, certaines limitations cinétiques et stœchiométriques demeurent (Schaich *et al.* 2015).

La plupart de ces tests *in vitro* sont colorimétriques et nécessitent simplement une mesure par spectrophotométrie (excepté l'ORAC, entre autres, basé sur la fluorimétrie). À noter qu'il existe des techniques couplées, généralement chromatographiques qui mettent en œuvre ces tests colorimétriques et permettent d'estimer directement l'activité antioxydante des métabolites au sein d'un extrait. Les méthodes HPLC sont les plus populaires (post-colonne, pré-colonne, *spiking*), principalement couplées à des

évaluations de l'activité antioxydante par test ABTS ou DPPH. Généralement utilisées pour le criblage ou *screening* des composés antioxydants, ces méthodes sont reconnues pour leur rapidité et simplicité d'usage. En particulier, comparativement aux procédures de purification et d'isolement usuellement nécessaires avant d'évaluer les activités individuelles des composés (Chandrasekar *et al.* 2006 ; Meda *et al.* 2017a ; Tang *et al.* 2008 ; Yamaguchi *et al.* 1998 ; Yang *et al.* 2016 ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). Toutefois, comme discuté au chapitre 4, la pertinence des résultats proposés par ces techniques couplées peut être remise en question.

Tableau I.4 : Principaux tests chimiques pour la mise en évidence d'extractibles antioxydants. (Foti 2007 ; Li, X. 2017 ; Pinchuk *et al.* 2012 ; Prior *et al.* 2005 ; Rizvi 2010 ; Schaich *et al.* 2015)

Test	Mécanisme	Principe et mode de mesure	Expression des résultats
ORAC	HAT	capacité de l'antioxydant testé à protéger une sonde fluorescente ( <i>e.g.</i> fluorescéine) d'un oxydant ( <i>e.g.</i> AAPH), dosage de la sonde par fluorimétrie.	capacité antioxydante en équivalents Trolox (TEAC)
DPPH	SPLET	dosage colorimétrique à 516 nm du radical DPPH <sup>•</sup> (violet) non converti en DPPH-H (jaune).	TEAC ou activité antioxydante (EC <sub>50</sub> )
ABTS	HAT/SET	ABTS préalablement oxydé en ABTS <sup>•+</sup> (couleur intense), puis décoloration mesurée (415 ou 734 nm) suite à l'ajout des antioxydants potentiels.	TEAC
PTIO	HAT	radical PTIO <sup>•</sup> converti en PTIO-H en solution tamponnée, dosé colorimétriquement à 557 nm.	EC <sub>50</sub>
FRAP	SET	réduction d'une triazine ferrique (Fe <sup>3+</sup> TPTZ) à pH 3,6 en triazine ferreuse (Fe <sup>2+</sup> TPTZ), dosage à 593 nm par colorimétrie.	équivalents Fe <sup>2+</sup>
CuPRAC	SET	réduction de Cu (II) en Cu (I), complexation de Cu (I) avec la bathocuproïne (490 nm) ou la néocuproïne (450 nm).	TEAC

### I.2.3.5.2. Bioactivités au sein des érables

Particulièrement étudiés pour leurs composés phénoliques, *Acer rubrum* et *Acer saccharum* ont démontré des activités antioxydantes significatives qu'elles soient évaluées sur des extraits (éthanoliques, méthanoliques, aqueux) ou en testant des composés purs (maplexines, ginnalines, saccharumosides) (Royer *et al.* 2011 ; Yuan *et al.* 2011, 2012). Toutefois, d'autres bioactivités ont été mises en évidence :

- Des activités antibactériennes, antivirales et antifongiques ont été mises en évidence pour des extraits de feuilles d'érable (en particulier pour AR et AS). Des résultats pouvant être expliqués en partie par l'omniprésence de l'acide gallique (actif sur certaines souches fongiques) au sein des maplexines et ginnalines et la proximité avec l'acide tannique et autres gallotannins reconnus pour leur inhibition de bactéries à Gram négatif voire à Gram positif (Bi *et al.* 2016 ; Wu *et al.* 2010).

- L'activité anticancer ou anti-tumorale a également été investiguée chez l'érable rouge et l'érable à sucre. En particulier, les maplexines, ginnalines et certains dérivés de saccharosides stimulent l'apoptose (mort cellulaire programmée) et l'arrêt du cycle cellulaire chez des cellules cancéreuses humaines (González-Sarrías *et al.* 2012b, 2013 ; Rayavarapu *et al.* 2017).
- Les ginnalines ainsi que la catéchine et l'épicatéchine, présentes chez *Acer rubrum* ont montré une activité anti-inflammatoire en inhibant la formation de monoxyde d'azote (NO), un intermédiaire de l'inflammation, dans des cellules de macrophages stimulées par des liposaccharides (Bi *et al.* 2016).
- Des indices d'activité anti-diabète ont été trouvés pour les maplexines. En effet, ces composés induisent l'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase responsable de la dégradation des polysaccharides en sucres simples (Wan *et al.* 2012a).
- Plus récemment, les gallotannins d'érable (*glucitol-core containing gallotannins*), regroupant les ginnalines et maplexines ont démontré des activités anti-tyrosinase et anti-mélanogénique soulignant leur potentiel pour des applications en cosmétique basées sur le blanchiment de la peau (Ma *et al.* 2017 ; Seeram *et al.* 2017).
- Il a été prouvé que ces mêmes composés possèdent des propriétés anti-glycation. Les digalloyl-glucitols en particulier, sont susceptibles d'interférer par piégeage de radicaux et chélation de métaux dans la formation des produits de la glycation (Ma *et al.* 2016). Ces résultats semblent prometteurs au vu de l'implication de la glycation, induisant l'oxydation de protéines, de l'ADN et de lipides, dans des maladies chroniques telles que le diabète, les cancers et d'autres maladies dégénératives.

Devant les nombreuses bioactivités potentielles et la richesse de composés disponibles, plusieurs types de valorisations chimiques sont possibles pour les écorces et plus généralement pour la biomasse de l'érable. Il est possible de généraliser ces valorisations en un même concept : la bioraffinerie.

### **I.3. Valorisation des extractibles de l'écorce par la bioraffinerie**

#### **I.3.1. La bioraffinerie : exemples et marché**

Le concept de « bioraffinerie » se trouve de plus en plus présent dans les industries forestière, agricole et agro-alimentaire. Il se positionne comme un des éléments de réponse à la pénurie croissante de ressources combinée à l'accroissement de la population mondiale par une réutilisation et une transformation maximale de la biomasse. En particulier, en proposant des alternatives aux simples enfouissement et incinération des résidus, sous-produits et co-produits de ces industries (Chemat *et al.* 2012 ; Feng *et al.* 2013). Cette stratégie de production durable a connu plusieurs stades de développement. Les bioraffineries de 1<sup>ère</sup> génération basées principalement sur la production de bio-carburants à partir de biomasse agricole riche en sucres ont démontré leurs limites sociales et environnementales. La bioraffinerie forestière (2<sup>ème</sup> génération) se concentre actuellement sur des alternatives plus viables en produisant bio-fuel, bio-char et autres bio-huiles. Les bioraffineries de 3<sup>ème</sup> génération développent différentes valorisations de biomasse marine (algues, co-produits de l'industrie des produits de la mer...) tandis que celles de 4<sup>ème</sup> génération sont

spécialisées, entre autres, dans le traitement et la valorisation des déchets organiques domestiques pour la production de bio-gaz (Batsy *et al.* 2012).

Ces dernières années, la production de biocombustibles et d'énergie à base de biomasse forestière est demeurée stable au Québec avec près de 2,6 millions de tonnes métriques anhydres (tma) de biomasse utilisée par an (2009–2013) dont environ 80% d'écorce (MERN 2015). Au total, 17 millions de m<sup>3</sup> d'écorce sont générés chaque année au Canada (Feng *et al.* 2013), dont environ 4 millions de tonnes au Québec (MERN 2002). Ces chiffres sont en grande partie expliqués par la nécessité de séparer l'écorce du bois dans l'industrie du sciage, où environ 2,3 millions de tma d'écorce sont générées par an (CIFQ 2013). L'industrie des pâtes et papiers contribue également à ce total puisque 300 kg d'écorce résultent de la production d'une tonne de pulpe (Bajpai 2015). En termes de coût, l'écorce, à environ 30 \$/tma livrée représente un faible investissement comparativement aux autres types de biomasse forestière disponible au Québec, généralement plus proches de 100 \$/tma livrée (MERN 2015). Au niveau énergétique, l'écorce présente des caractéristiques intéressantes puisque 10 tonnes produisent la même énergie que 7 tonnes de charbon (houille) ou encore 5 tonnes de pétrole. Toutefois, pour atteindre de telles valeurs, l'écorce doit être anhydre ce qui pose une contrainte majeure. Dans le cas contraire, son pouvoir calorifique passe de 8500–10500 kJ anhydre à 0 kJ à partir de 87% d'humidité (sur base humide) (Harkin et Rowe 1971).

Outre la valorisation énergétique, la bioraffinerie forestière se concentre également sur la production de produits chimiques à plus haute valeur ajoutée pour des applications dans des domaines tels que les adhésifs et les matériaux. Pour de telles applications, les tannins condensés et lignines principalement extraits de l'écorce représentent un marché en pleine expansion. Par exemple, il est possible de produire des panneaux composites à base d'écorce et d'adhésifs ou de résines issus de mélanges agent liant (tannins, lignines)/agent durcisseur (paraformaldéhyde, glyoxal, ou encore dérivés diisocyanates), ces derniers étant le plus souvent non bio-sourcés (Feng *et al.* 2013 ; Pizzi 2016).

La production de composés à haute valeur ajoutée bénéficie également aux secteurs liés à la chimie fine (cosmétique, alimentaire ou encore pharmaceutique). Plutôt que de synthétiser les pigments, arômes, antioxydants, ou autres molécules nécessaires à ces industries, un des aspects prépondérants de la bioraffinerie consiste à les extraire de la biomasse (Chemat *et al.* 2012 ; Otieno et Ahring 2012). La production d'huiles essentielles comme arômes alimentaires ou à la base de la formulation de parfums peut ainsi être couplée avec l'extraction de composés antioxydants. À titre d'exemple, on peut citer l'huile essentielle de romarin duquel on peut aussi extraire des acides phénoliques, ou encore l'écorce d'épinette noire qui outre son huile essentielle contient du *trans*-resveratrol parmi d'autres stilbènes antioxydants (Chemat *et al.* 2012 ; Francezon et Stevanovic 2017b). D'autres composés bioactifs peuvent être récupérés à partir d'écorce. La bétuline peut être extraite de l'écorce de bouleau à l'aide de solvants durables (Ekman *et al.* 2013). Tandis qu'il est possible d'obtenir des polysaccharides solubles dans l'eau chaude et démontrant des propriétés d'immunostimulation, à partir de l'écorce d'épinette de Norvège (Le Normand *et al.* 2014).

Ce fort potentiel de l'écorce pour des applications de bioraffinerie ciblant la chimie fine, a motivé la présentation préalable des extractibles hydrosolubles et de leurs bioactivités pour maintenant s'intéresser aux différents procédés et modes de production permettant leur obtention sans perte de leurs propriétés.

### **I.3.2. Les techniques d'extraction**

Du point de vue de la pharmacognosie, l'extraction des plantes médicinales (utilisées telles quelles en médecine traditionnelle) consiste par définition à réunir sous un volume réduit la majorité de leurs constituants actifs (Vercauteren 2011). Dans le cas de la bioraffinerie, l'extraction se veut plus comme un outil à la valorisation de résidus qui autrement ne pourraient être utilisés dans le cadre des sciences liées à la santé humaine. Les molécules isolées pouvant être de même nature que celles issues de plantes médicinales, la valeur ajoutée apportée à l'écorce par ce procédé semble donc considérable.

#### **I.3.2.1. Concepts de l'extraction et paramètres importants**

L'extraction est un procédé basé sur la diffusion d'un solvant au sein d'une matrice. Dans le cadre de l'étude, on s'intéresse à la matière végétale et en particulier à l'écorce. Le procédé consiste en un transfert de masse de solutés, les extractibles, depuis la matrice où ceux-ci sont initialement adsorbés, vers le solvant dans lequel ils vont être solvatés. Plusieurs paramètres vont alors entrer en jeu dans la rupture des interactions chimiques ou physiques liant les extractibles à la matrice écorce. Parmi ceux-ci, l'affinité du solvant avec les substances à solvater (paramètre de solubilité de Hildebrand, propension à former des liaisons H), l'apport énergétique par la température, la durée d'extraction, l'apport mécanique pour favoriser la diffusion *e.g.* par agitation, sonication, ou bien par l'usage d'un solvant sous pression qui facilitera la pénétration dans les pores de la matrice (Co 2010 ; Cuevas Valenzuela *et al.* 2017 ; Rydberg 2004). Un exemple de l'enjeu que représentent ces paramètres est présenté en **Figure I.39** par le truchement des différentes configurations des extractibles au sein d'une matrice végétale telle que l'écorce. Les molécules extractibles les plus accessibles sont représentées en 3 et 4, tandis que la difficulté de l'extraction se trouve dans la récupération de celles représentées en 1 et 2. Le pré-traitement de la matière première a une influence primordiale sur l'efficacité de l'extraction, en particulier la réduction des tailles de particules qui va permettre d'en maximiser la surface spécifique et de limiter la proportion d'extractibles des cas 1 et 2. D'autres considérations pré-extraction vont également influencer sur l'extraction, mais aussi sur la phase post-extraction et la préservation de la qualité des extractibles, comme par exemple : la période de collecte initiale du matériel biologique, le devenir de celui-ci, ses conditions de stockage, de séchage, ou encore la protection contre la prolifération bactérienne (Co 2010 ; Galanakis 2015a ; Rostagno et Prado 2013).

Outre ces pré-traitements adaptables aux différentes matrices à extraire, des techniques d'extraction variées ont été mises en place selon les attentes des expérimentateurs en termes de types de composés, de rendement, de qualité des extraits et selon leurs besoins en termes de mise à l'échelle. En se basant sur les conditions physiques du solvant d'extraction, cette revue propose de classer ces techniques selon quatre catégories : l'extraction solide-liquide, l'extraction par fluide pressurisé, l'extraction par fluide supercritique,

et l'extraction par entraînement à la vapeur. Les principales techniques d'extraction des différents composants anatomiques de l'érable disponibles dans la littérature sont majoritairement des extractions solide-liquide. L'extraction par fluide pressurisé pourrait également être intéressante pour la valorisation d'extractibles hydrosolubles de l'érable, l'accent sera donc mis sur ces deux modes d'extraction. À l'inverse, les extractions par fluide supercritique et par entraînement à la vapeur sont plus adaptées pour la récupération de composés hydrophobes et seront donc plus brièvement décrites.

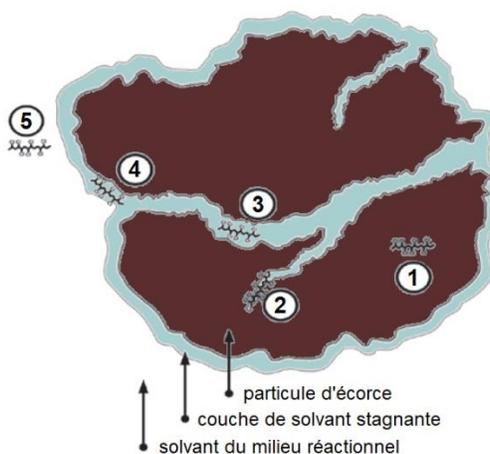


Figure I.39 : Représentation schématique d'une particule d'écorce dans son solvant d'extraction. 1, molécule liée à la matrice ; 2, molécule adsorbée ou en solution dans un micro/nano pore ; 3, molécule adsorbée ou en solution dans pore ; 4, molécule chimiquement liée à la matrice ; 5, molécule libre dans le solvant d'extraction. Reproduction de Rizvi (2010) avec autorisation de Elsevier.

### I.3.2.2. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide représente le type d'extraction le plus utilisé. Plus aisée à mettre en œuvre et également moins onéreuse en installations logistiques, elle est de préférence employée pour des solvants organiques (hydrocarbures aliphatiques, halogénés, alcools). Néanmoins, les durées d'extraction relativement longues et les quantités importantes de solvant nécessaires à grande échelle peuvent rendre cette technique assez coûteuse. Elle est donc privilégiée en règle générale à l'échelle du laboratoire (Co 2010).

Pour illustrer la prépondérance de cette technique, il a été intéressant de recenser les différentes conditions d'extraction utilisées pour les érables, en particulier, pour l'écorce d'*Acer rubrum* et *Acer saccharum*. Si les études présentées sont toutes basées sur des extractions solide-liquide, les solvants d'extraction sont variables (**Tableau I.5**).

Les macérations méthanoliques d'AR et AS présentées dans le **Tableau I.5** illustrent bien le problème de durée de ce type d'extraction. La mise en balance avec l'extraction à l'eau chaude montre également de grandes différences en termes de rendements soulignant son intérêt dans l'optique d'une valorisation plus large de l'écorce. En plus des composés identifiés démontrant un certain caractère hydrophile, il semble possible de récupérer grâce à l'eau chaude d'autres composés hydrosolubles. Bien que traitant d'une autre essence du genre *Acer*, l'extraction à l'eau chaude en deux étapes (avec changement de solvant) dans le cas de l'écorce d'*Acer nikoense* témoigne de l'intérêt potentiel d'un tel procédé pour extraire

des composés glycosylés à génines peu polaires (Nitta *et al.* 1999). Le **Tableau 1.5** montre donc la pertinence d'investiguer l'extraction à l'eau chaude de l'écorce d'érable comme source de composés bioactifs. Ce type d'extraction qui permettrait ainsi, d'ouvrir la voie à une alternative aux procédés d'extraction par solvants organiques polaires, serait plus économique (coût du solvant et durée d'extraction moindres) et plus durable (utilisation d'un solvant vert, l'eau).

*Tableau 1.5 : Exemples de conditions d'extractions des érables et composés associés.*

matière première	solvant, ratio <sup>1</sup>	température, durée	rendement	extractibles	références
AR (écorce)	ether de pétrole, diéthyléther, acétone	à froid	-	proanthocyanidines	(Narayanan et Seshadri 1969)
AR/AS (écorce)	H <sub>2</sub> O, 1/20	autoclave 15 psi, 20 min	-	catéchine, acide gallique	(Tattar et Rich 1973)
AS (écorce)	EtOH, Soxhlet (solvant régénéré)	ebullition, 10 h	6%	-	(Huang et Yan 2014)
AS (écorce)	EtOH 95%, 1/8	ambiante, 24 h	2%	phytostérols	(St-Pierre, F. <i>et al.</i> 2013)
AS (écorce)	MeOH, 1/2,4	ambiante, 3 × 7 jours	8%	glycosides phénoliques	(Yuan <i>et al.</i> 2011)
AR (tronc)	MeOH, 1/1,6	ambiante, 3 cycles	8%	maplexines, ginnalines	(Wan <i>et al.</i> 2012b)
AR (écorce)	MeOH, 1/3,5	ambiante, 3 × 7 jours	12%	maplexines, ginnalines	(Yuan <i>et al.</i> 2012)
AR (écorce)	H <sub>2</sub> O, 1/10	100°C, 1 h	21%	tannins et autres	(Royer <i>et al.</i> 2011)
AN (écorce)	H <sub>2</sub> O, 1/10	100°C, 2 × 1 h	-	diarylheptanoïdes glycosylés	(Nitta <i>et al.</i> 1999)

<sup>1</sup> ratio matière première sèche/solvant.  
AR, *Acer rubrum* ; AS, *Acer saccharum* ; AN, *Acer nikoense*

Outre l'utilisation de l'eau chaude pour améliorer les rendements et la faisabilité d'extraction, il est possible d'assister l'extraction par solvants traditionnels en ayant recours à des procédés physiques. Des techniques d'extraction assistées par micro-ondes, ultrasons ou encore rayonnement sont développées depuis plusieurs années dans l'industrie agroalimentaire et considérées comme viables pour des applications à plus grande échelle (Rizvi 2010). L'utilisation d'un champ électrique pulsé, d'un laser pulsé ou de décharges électriques à haut voltage pour améliorer l'extraction en sont d'autres exemples. Augmentant significativement l'extraction de jus et de pectine, ces techniques sont basées au même titre que les extractions assistées par ultrasons sur la création de pores (cavitation) au sein des membranes cellulaires de

la matrice à extraire. D'autres techniques plus douces pour assister l'extraction sont basées sur l'apport de chaleur au système solvant/matrice tels que le chauffage ohmique, par radio-fréquences ou par micro-ondes. Le chauffage permet une cavitation plus progressive et donc réduit les risques de dégradation pour les molécules à extraire (Galanakis 2015a ; Rizvi 2010 ; Rostagno et Prado 2013).

### I.3.2.3. Extraction par fluide sous haute pression

Autre procédé d'intérêt pour les composés hydrosolubles, l'extraction par fluide pressurisé (PFE) aussi appelée extraction par solvant accéléré (ASE) permet l'accès à de hautes températures (jusqu'à 200°C) tout en gardant le solvant utilisé (*e.g.* eau, éthanol) sous pression et donc à l'état liquide. Bien que relativement énergivore, ce procédé est particulièrement adapté pour l'extraction à l'eau chaude de composés phénoliques entre autres, mais la possible dégradation des composés reste un désavantage. Comme présenté en **Figure I.40**, ce procédé d'extraction est assez polyvalent grâce à la possibilité d'utiliser des mélanges de solvants de différentes polarités et proticités. Ceci permet de réaliser des extractions sélectives de composés spécifiques d'une même matrice et ainsi de réduire les étapes de séparation post-extraction. Enfin cette technique est particulièrement adaptée à l'écorce ayant déjà été employée pour la récupération de composés phénoliques et antioxydants des écorces de pin et de bouleau (Co 2010 ; Rizvi 2010 ; Rostagno et Prado 2013).

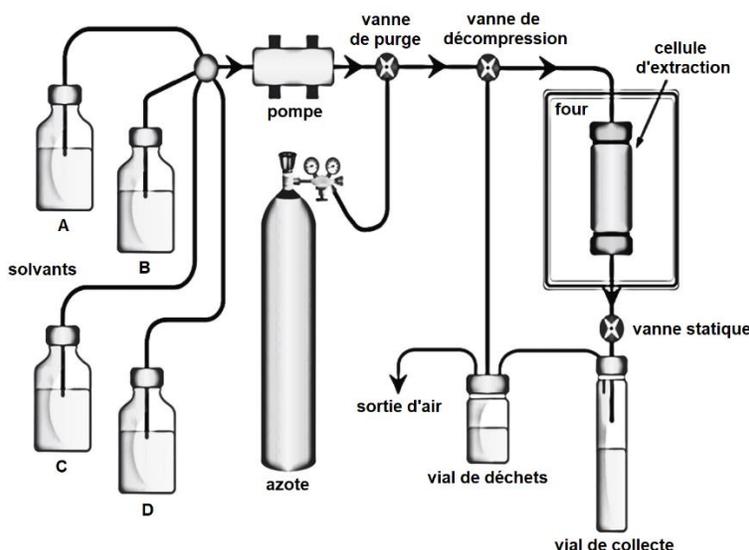


Figure I.40 : Représentation schématique d'un appareillage d'extraction par fluide pressurisé.  
Reproduction de Rizvi (2010) avec autorisation de Elsevier.

Variante de cette technique, la méthode d'extraction sous ultra-haute pression (UPE) ou extraction sous haute pression hydrostatique (HHPE) est une méthode émergente. Comme l'indiquent ses dénominations, elle repose sur l'utilisation de pressions très élevées (100–600 MPa). La compression du fluide entraîne une augmentation de température permettant de s'affranchir de chauffer le milieu réactionnel. Bien qu'au stade de développement, cette méthode possède de nombreux atouts (hauts rendements

d'extraction, temps d'opération réduit, faible consommation de solvant et d'énergie) (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017 ; Rostagno et Prado 2013).

#### **I.3.2.4. Extraction par fluide supercritique, extraction par entraînement à la vapeur**

Comme la chromatographie en phase supercritique présentée en I.2.3.4.2.3., l'extraction par fluide supercritique (SFE) utilise un fluide dans des conditions intermédiaires à celles que présentent les liquides et les gaz. Le plus utilisé, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) supercritique, permet lorsque la solvataion des molécules d'intérêt est possible (peu adapté pour des molécules polaires), non seulement, de récupérer un extrait sans solvant, mais aussi de mener l'extraction dans des conditions douces de température (T°<sub>critique</sub> de 31°C à 73,9 bar) pour éviter la dégradation de composés thermosensibles (Co 2010). La SFE se pose comme une alternative à des solvants organiques toxiques tels que l'hexane, le dichlorométhane ou le chloroforme, le CO<sub>2</sub> ayant l'avantage d'être classé GRAS (*generally recognised as safe*). Il est également possible d'utiliser un co-solvant (EtOH, MeOH voire H<sub>2</sub>O) pour augmenter la polarité de la phase, toutefois la SFE reste très limitée pour l'extraction de composés hydrosolubles. Quelques études ont toutefois reporté l'extraction de composés phénoliques, principalement des flavonoïdes, mais les rendements demeurent faibles (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017 ; Rizvi 2010 ; Rostagno et Prado 2013). À l'inverse, la technique est particulièrement adaptée pour l'extraction d'huiles essentielles et propose une alternative à l'extraction par entraînement à la vapeur pouvant s'avérer plus coûteuse à grande échelle. Cette technique plus conventionnelle se focalise sur la vaporisation d'eau, et utilise la vapeur ainsi produite comme solvant d'extraction. Si les principaux composés extraits sont des monoterpènes voire sesquiterpènes volatils (huiles essentielles), il est également possible de récupérer un hydrolat, sous-produit de l'huile essentielle constitué principalement de composés terpéniques hydroxylés ou carbonylés et donc partiellement hydrosolubles (Chemat *et al.* 2012 ; Galanakis 2015a).

#### **I.3.3. Traitements post-extraction des extraits**

Après extraction de la matière première, le devenir des extraits implique le plus souvent des traitements post-extraction. Ceux-ci sont primordiaux puisque le produit d'une extraction n'est généralement pas utilisable pour une application directe. Il peut être nécessaire de concentrer voire isoler des extractibles d'intérêt. À l'opposé, certains constituants nécessitent d'être enlevés de l'extrait, en particulier le solvant d'extraction qui peut représenter un danger pour la santé humaine dans le cas d'applications médicales, pharmaceutiques, alimentaires ou bien cosmétiques. La FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) regroupe ces solvants en trois classes selon leur degré de toxicité et les doses tolérées : Classe 1 (*e.g.* benzène, dichloroéthane) à 2–1500 ppm, Classe 2 (*e.g.* hexane, méthanol) à 50–3000 ppm et Classe 3 (*e.g.* éthanol, acétone) < 5000 ppm, l'eau étant hors classement dû à sa non-toxicité. Toutefois, même dans le cas de l'eau, il est généralement avantageux de sécher l'extrait pour éviter tout développement bactérien ou dénaturation enzymatique (*e.g.* perte d'unités glycosides), une autre option pouvant être de formuler les extraits naturels avec des composés protecteurs préservant leur qualité (Rostagno et Prado 2013 ; Sarker *et al.* 2005). Cette

partie se focalise donc sur les traitements post-extraction susceptibles d'être employés suite à une extraction à l'eau chaude pour produire un extrait sec avec un minimum de dénaturation de ses propriétés biologiques. Ces traitements ont été divisés entre la concentration des extraits et leur séchage.

### I.3.3.1. Techniques de concentration des extractibles

Dans cette partie sont présentées les différentes méthodes employées dans les industries utilisant des produits naturels pour concentrer les extraits comme *totum* ou bien certains composés de manière plus spécifique.

#### I.3.3.1.1. Évaporation sous vide

Une des techniques universelles de laboratoire est la séparation des molécules extractibles solides de leur solvant rendu volatil, qualifiée d'évaporation. Le changement d'état du solvant liquide en un gaz permet la séparation. Toutefois, cette opération peut être difficile à mettre en œuvre lorsque le solvant est peu volatil (*e.g.* eau, *n*-butanol) et nécessite alors une pression réduite, on parle alors d'évaporation sous vide (**Figure I.41**). Cette technique est largement utilisée pour la concentration de produits à haute valeur ajoutée tels que les vitamines ou les composés à usage pharmaceutique. Dans le cas de l'eau, l'évaporation sous vide peut s'avérer assez énergivore compte tenu du changement d'état liquide à gazeux. La pompe doit maintenir un vide statique voire dynamique l'extrait doit être gardé en température, en pratique 60–70°C (Rostagno et Prado 2013). L'absence de pertes de composés non volatils demeure un des points forts de cette méthode et justifie son intérêt dans l'industrie pharmaceutique.

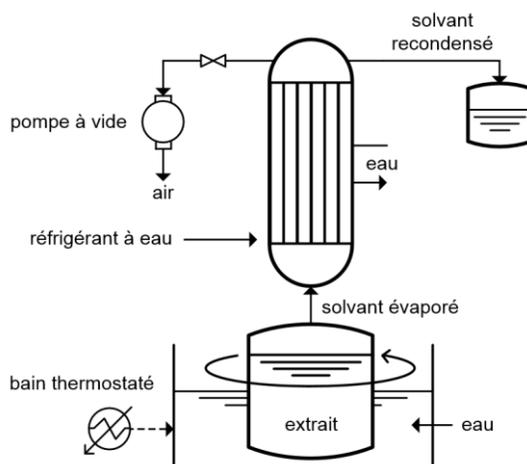


Figure I.41 : Représentation schématique d'un appareillage d'évaporation sous vide simple ou rotavap.

Outre les systèmes rotatifs, d'autres types d'évaporation sous vide sont utilisés à grande échelle. On peut citer les systèmes à flot tombant, à circulation naturelle ou encore à fluide frigorigène, qui peuvent aussi être mis en œuvre en récupérant l'essentiel de la chaleur fournie pour limiter la consommation énergétique du procédé (techni-contact.com 2016).

### I.3.3.1.2. Fractionnement liquide–liquide et extraction en phase solide

Correspondant à une phase de pré-isolement ou d'enrichissement, la partition liquide–liquide aussi appelée fractionnement liquide–liquide permet contrairement à l'évaporation de concentrer de manière spécifique les composés extractibles issus d'un extrait brut. Le principe de la partition consiste à mélanger deux solvants immiscibles dans une ampoule puis laisser décanter pour obtenir deux phases au sein desquelles se répartissent les composés selon leur coefficient de partition (affinité avec le solvant). Un des deux solvants étant généralement l'eau, cette étape de mélange/décantation peut être répétée pour épuiser au maximum la phase aqueuse. Pour le deuxième solvant, on privilégie souvent un solvant apolaire aprotique en première instance pour continuer la partition en utilisant des solvants de polarité croissante mais toujours immiscibles avec l'eau (**Figure I.42**). Dans le cas du *n*-butanol, une saturation est recommandée dû à sa miscibilité partielle avec l'eau (Rostagno et Prado 2013).

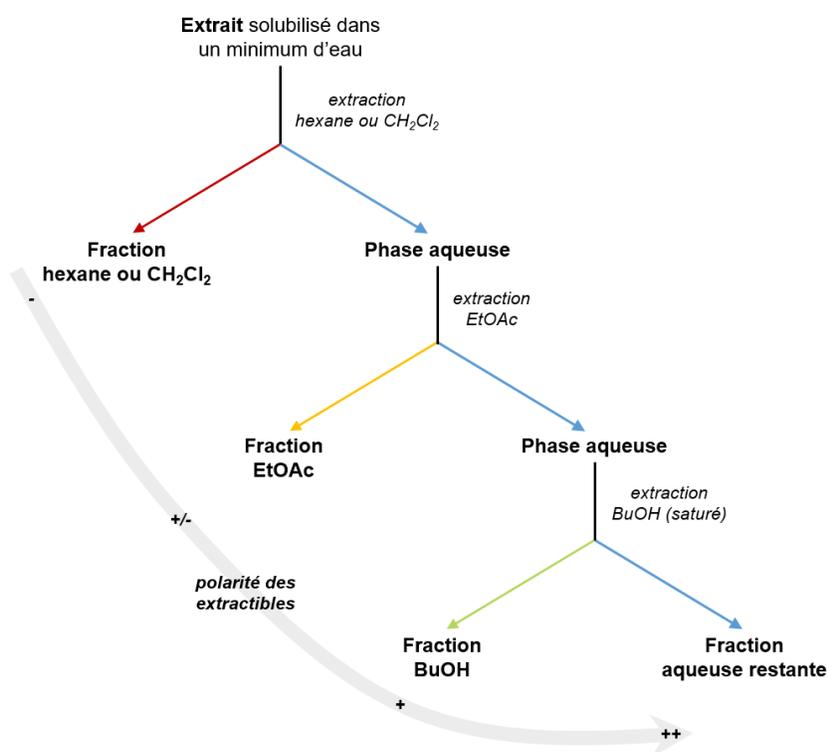


Figure I.42 : Schéma typique de partition d'un extrait aqueux ou alcoolique.

La majorité des études détaillant la purification d'extraits d'érables rouge et à sucre s'intéressent uniquement à la fraction acétate d'éthyle (AR, AS) pour isoler les molécules phénoliques explicitées en I.2.3.2.2. (Hatano *et al.* 1990 ; Li, L. et Seeram 2011 ; Wan *et al.* 2012a, 2012b ; Yoshikawa *et al.* 2011 ; Yuan *et al.* 2012, 2013). Si une étude s'intéresse en particulier à la fraction butanolique de sirop d'érable (Li, L. et Seeram 2010), uniquement deux articles s'intéressent aux deux types de fractions pour la purification d'extraits d'écorce (AS) et de bourgeons (AR), respectivement (Meda *et al.* 2017b ; Yuan *et al.* 2011). À noter que l'étude sur les extraits de bourgeons a également investigué la fraction aqueuse restante. Dans le cadre d'une étude basée sur des extraits à l'eau chaude d'écorce d'érable, cette fraction pourrait se révéler

d'un grand intérêt pour l'isolement d'hétérosides phénoliques mais aussi d'autres types de composés tels que des saccharides voire des protéines.

Outre la partition liquide-liquide, une technique combinant extraction solide-liquide et séparation chromatographique appelée extraction en phase solide (SPE) est aussi utilisée pour la séparation spécifique de produits naturels. L'utilisation d'un medium solide en polymère à empreinte moléculaire (PEM) rend cette méthode plus spécifique que la simple extraction liquide-liquide. En effet, similairement aux phases stationnaires en chromatographie liquide, il existe des PEM à échange d'ions, en phase normale, en phase inverse ou encore des PEM de poly(styrène-divinylbenzène) pour l'exclusion stérique (He *et al.* 2007 ; Rostagno et Prado 2013). L'utilisation successive de phases mobiles de différentes natures à travers l'échantillon retenu par la matrice stationnaire permet la récupération sélective des composés (**Figure I.43**).

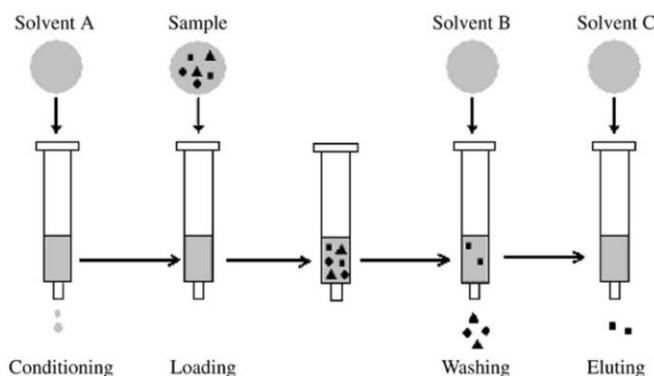


Figure I.43 : Représentation schématique d'une extraction en phase solide.  
Reproduction de He *et al.* (2007) avec autorisation de Elsevier.

### I.3.3.1.3. Filtration membranaire

La filtration membranaire regroupe plusieurs techniques adaptées pour concentrer sélectivement ou non les composés extractibles. Procédé ancien, mais dont l'utilisation s'est plus largement répandue à partir des années 1970 dans l'industrie agroalimentaire (industrie laitière, boissons, jus de fruits, acériculture), pharmaceutique ou encore chimique, cette technique est très usitée à l'heure actuelle pour une large gamme d'applications (Baker 2012). En cause, sa bonne sélectivité et ses conditions douces de fonctionnement (faibles températures, absence de changement d'état), entraînant une faible consommation énergétique, le procédé étant simplement basé sur la mise sous pression modérée du système. Ces caractéristiques en font ainsi une solution à la fois économique avec relativement peu d'impact sur l'environnement (Arzate 2008). Contrairement à la filtration au sens conventionnel du terme (macrofiltration), la filtration par membrane ne se contente pas d'isoler les particules immiscibles d'un fluide. Son action de barrière sélective lui permet de séparer les composés en solution en retenant certains et en favorisant la perméation d'autres (Cheyran 1998). Ce principe soulève certaines problématiques discutées par la suite, comme par exemple, l'influence de la nature de la membrane sur la séparation, de sa géométrie, des interactions possibles avec certains solutés, ou encore les difficultés posées par le phénomène d'encrassement des membranes (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017).

### **I.3.3.1.3.1. Les différentes échelles de filtration**

Bien que la géométrie des membranes ainsi que leurs matériaux constitutifs puissent être variables d'un procédé à un autre, la différence majeure qui permet de classer les procédés de filtration membranaire reste l'étendue des diamètres de pores. On parle ainsi de procédé de microfiltration, d'ultrafiltration, de nanofiltration ou encore d'osmose inverse (*Figure I.44*). Habituellement, les fabricants de membranes ne basent pas leurs modèles sur une taille de pores à proprement dite (celle-ci est souvent variable car difficile à contrôler parfaitement). La référence est plutôt le seuil de coupure nominal de la masse moléculaire (NMWC) plus souvent désigné par son équivalent anglais, MWCO pour « molecular weight cut-off ». Le MWCO correspond à la masse moléculaire d'un soluté non chargé subissant un rejet par la membrane de 90% soit une perméation de 10% des composés à cette masse moléculaire (Galanakis 2015a).

#### ***Microfiltration***

La microfiltration (MF) désigne le procédé membranaire basse pression (0,5–2 bar), assurant une rétention de l'ordre du micron, soit en pratique une étendue de 0,01 à 5  $\mu\text{m}$ . Cette technique est principalement utilisée pour la clarification car elle permet de séparer les particules en suspension et les bactéries ( $M_w > 500$  kDa), des espèces solubles (Bernardes 2014). Appliquée à la clarification de jus de fruits, la microfiltration procure certains avantages : les adjuvants de filtration nécessaires pour des procédés plus classiques deviennent inutiles et le traitement enzymatique de dépectinisation est réduit voire supprimé (Carvalho *et al.* 1998 ; Riedl *et al.* 1998). Dans le cadre d'un traitement post-extraction, cette technique pourrait s'avérer très utile pour assurer l'absence de microbes au sein de l'extrait aqueux mais aussi de fines particules d'écorce résiduelle.

#### ***Ultrafiltration***

Autre procédé, à échelle de pores inférieure, l'ultrafiltration (UF) qui retient théoriquement les macromolécules ou particules de taille plus grande que 1 à 20 nm, ce qui correspond en termes de masse moléculaire à la rétention de composés colloïdaux ou de macromolécules dépassant généralement les 2 kDa (Bernardes 2014). Ce procédé physique de séparation mis en œuvre à basse pression (1–7 bar), permet la perméation de l'eau, des sels minéraux, des sucres simples et autres composés de masse moléculaire faible, pour conserver préférentiellement les protéines, les tannins et autres polymères naturels hydrosolubles. Très utilisée dans l'industrie des produits laitiers tels le lait, le fromage ou le yoghourt (McGregor 1986), l'ultrafiltration est également adaptée pour les extraits naturels (thé, café...) par sa capacité à concentrer les composés phénoliques d'intérêt majeur pour les propriétés antioxydantes qui leur sont associées (Galanakis 2015b). Cette application sera discutée par la suite en section I.3.4.1.3.3.

#### ***Nanofiltration***

Procédé hautement sélectif, la nanofiltration (ou ultra-osmose) se base sur des membranes d'une dimension de pores inférieure à 1 nm et comprise entre 200 et 1000 Da (Bernardes 2014). L'utilisation de

membranes chargées associée à la faible taille de pores limite le passage des plus petites molécules organiques (Cheyran 1998). La perméation des sels minéraux, en particulier des ions de charge opposée à celle de la membrane (contre-ions) est favorisée, la perméation des co-ions est quant à elle relativement limitée (phénomène d'exclusion de Donnan) (Baker 2012). De manière générale, les ions multivalents et composés de masse molaire supérieure à environ 300 Da sont retenus, dépendant cependant de la nature de la membrane (Nyström *et al.* 1995). Les pressions nécessaires à la mise en œuvre de la nanofiltration (NF) sont plus élevées que pour les procédés de MF et d'UF, soit 5 à 25 bar (Bernardes 2014).

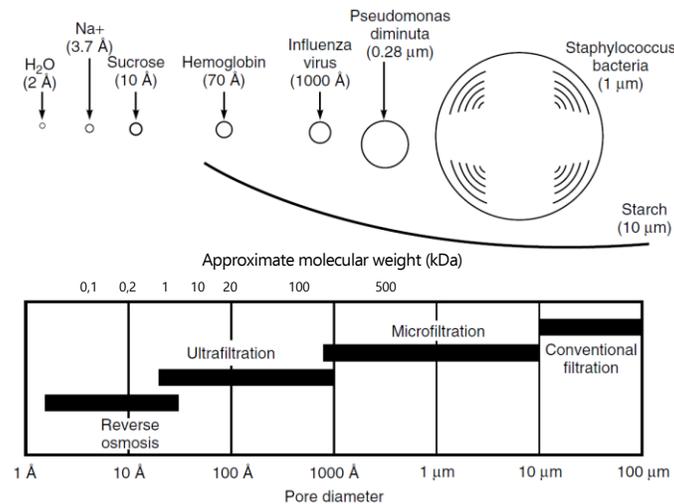


Figure 1.44 : Échelles de pores des différents types de filtration pour filtrer des composés et organismes spécifiques. Reproduction de Baker (2012) avec autorisation de Wiley.

### Osmose inverse

L'osmose inverse (OI) met en jeu des membranes moins perméables que celles utilisées en nanofiltration dans le but de laisser filtrer uniquement l'eau (membranes denses), on parle donc de procédé de concentration. Une pression plus élevée est nécessaire (15-80 bar) et le débit de perméat est réduit par rapport à la nanofiltration (Nyström *et al.* 1995). Toutefois, les membranes d'osmose retiennent la quasi-totalité des sels minéraux (membranes caractérisées en termes de rejet de NaCl, KCl ou CaCl<sub>2</sub>). Le principe d'osmose inverse repose en effet sur l'application d'une pression suffisante pour contrer la pression osmotique (**Figure 1.45**). Inverser la pression osmotique revient à inverser le flux d'eau, originalement, d'un milieu dilué vers un milieu concentré (recherche de l'équilibre) pour permettre de faire diffuser l'eau depuis le milieu concentré vers le plus dilué (Rostagno et Prado 2013). Ainsi, la concentration du milieu initialement concentré, peut encore augmenter. Ce procédé est assez couramment employé pour la désalinisation de l'eau (Bernardes 2014), pour concentrer des produits naturels tels que le café (Vincze et Vatai 2004) ou le sirop d'érable (Arzate 2008). En termes de concentration, l'osmose inverse semble présenter de nombreux avantages à l'évaporation sous vide (rotavap) souvent usitée dans la chimie des substances naturelles, puisque la température d'exécution de l'OI dépasse rarement 45°C (contrairement aux 60°C voire 70°C nécessaires en pratique pour une évaporation efficace par rotavap), préservant ainsi l'intégrité des composés thermosensibles présents dans la solution à concentrer. En effet, des températures supérieures à 50°C sont

considérées comme relativement néfastes envers certains composés tels que les vitamines ou composés aromatiques comme les flavonoïdes (Cissé *et al.* 2011). Cela dit, les différences de rapidité et de rendement entre les deux procédés et la prise en compte du prétraitement de la solution à concentrer (ex : extraction à 80 ou 100°C), sont susceptibles de pondérer ces considérations. La comparaison des deux techniques dans le cadre de la concentration d'une même solution semble alors pertinente.

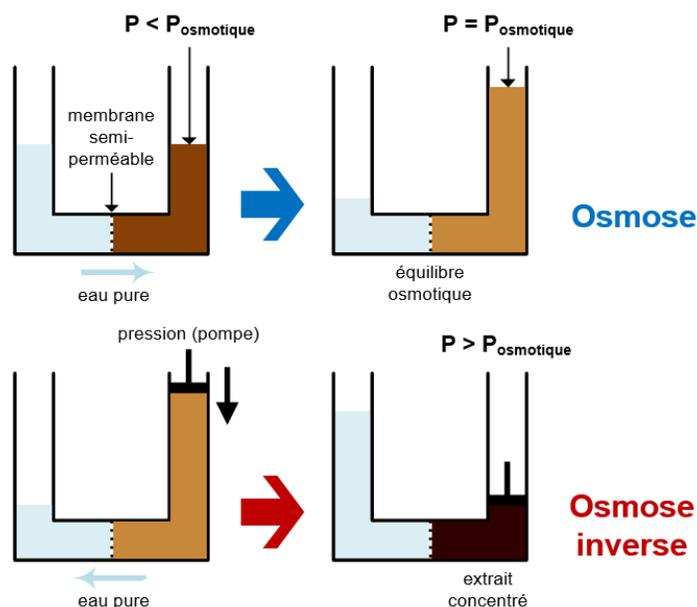


Figure I.45 : Principe de l'osmose inverse appliqué à un extrait aqueux.

### I.3.3.1.3.2. Les types de membranes

Les membranes utilisées en filtration sont principalement faites de matériaux polymères, voire de céramique et plus rarement de métal ou de verre. Moins durables que celles en céramique, les membranes d'ultrafiltration et de microfiltration en polymère ont une durée de vie pouvant tout de même dépasser les cinq ans selon l'application pour un coût de deux à quatre fois moindre (Koops 2010). Les matériaux les plus communément utilisés commercialement pour les membranes de microfiltration, d'ultrafiltration, de nanofiltration et d'osmose inverse sont présentés dans le *Tableau I.6*.

Outre le matériau constituant la membrane, la structure de celle-ci peut également varier d'une membrane à l'autre comme schématisé par la suite (*Figure I.46*). Les membranes peuvent être homogènes à l'échelle moléculaire telles que les membranes microporeuses (MF, UF) et non-poreuses denses (OI), toutes deux également isotropes. Ces deux types de membranes peuvent d'ailleurs être chargés, en particulier pour des utilisations en électrodialyse. Issues d'un développement plus récent, les membranes hétérogènes ou anisotropes répondent à la nécessité d'interfaces les plus fines possibles pour maximiser la vitesse du transfert de masse (Baker 2012). La plupart sont qualifiées de « composites » car elles contiennent différents matériaux (matrice et renfort) formant une couche de surface (parfois un film) dont le rôle est la séparation et une sous-structure servant uniquement de support mécanique (Koops 2010).

Tableau 1.6 : Matériaux constituant les membranes des différents procédés de filtration.  
(Baker 2012 ; Koops 2010)

Materiaux	Procédés membranaires			
	MF	UF	NF	OI
<b>Organiques</b>				
Cellulose	MF	UF	NF	OI
Acetate de cellulose	MF	UF	NF	OI
Nitrate de cellulose	MF			
Polysulfone	MF	UF		
Copolymère polysulfone/polyvinylpyrrolidone	MF	UF		
Copolymère polysulfone/alcool polyvinylique				OI
Polyéthersulfone	MF	UF		
Copolymère polyéthersulfone/polyvinylpyrrolidone	MF	UF		
Polyfluorure de vinylidène	MF	UF		
Teflon®, Polytétrafluoroéthylène	MF			
Polyacrylonitrile		UF		
Polyéthylène	MF			
Polypropylène	MF			
Polyimide		UF		
Polyamide	MF	UF		OI
Copolymère polyamide/polyurée				OI
Composites (polymérisation interfaciale, reticulation)			NF	OI
<b>Inorganiques</b>				
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MF			
γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		UF		
Zircone/alumine	MF			
Zircone/carbone	MF	UF		
Zircone/acier inoxydable		UF		
Silice	MF	UF		
Acier inoxydable type 316	MF			

MF : microfiltration, UF : ultrafiltration, NF : nanofiltration, OI : osmose inverse.

Quels que soient le matériau, le type de filtration membranaire, ou la structure de la membrane utilisée, un phénomène inévitable à plus ou moins long terme et d'une magnitude variable, demeure récurrent. L'encrassement ou colmatage (« fouling ») des membranes, à limiter au maximum, peut réduire de manière conséquente, voire finalement stopper, le débit de perméat. En effet, la filtration membranaire est principalement gouvernée par le MWCO résultant en un mécanisme de tamisage ou « sieving mechanism ». Si le tamisage est caractéristique de la MF, UF et NF, on parle plutôt de mécanisme de diffusion/exclusion lors de l'OI et en NF (Bernardes 2014). Il est donc attendu qu'une accumulation ou un dépôt de composés d'importante masse moléculaire (polymères, oligomères...) puisse entraîner ce phénomène d'encrassement. C'est particulièrement vérifié pour les membranes polysulfones (Galanakis 2015b). Autre cause connue d'encrassement, la polarisation de concentration qui se traduit par un gradient de concentration. La concentration plus élevée de soluté à la surface de la membrane peut réduire le flux à travers la membrane de manière drastique. Il y a également un risque de précipitation des solutés. Ce problème peut être minimisé par une température T optimisée (augmenter T réduit la viscosité du solvant et augmente la solubilité des solutés), et par une pression suffisante pour introduire un cisaillement (turbulences) dans la zone proche de la surface membranaire (McGregor 1986). Ainsi, un choix judicieux de température et de pression d'opération adaptée contribue de manière générale à la limitation du phénomène d'encrassement. Néanmoins,

selon le produit utilisé, le choix de la géométrie la plus adaptée est également crucial. Il en existe plusieurs types dont les caractéristiques sont présentées ci-après (**Tableau I.7**).

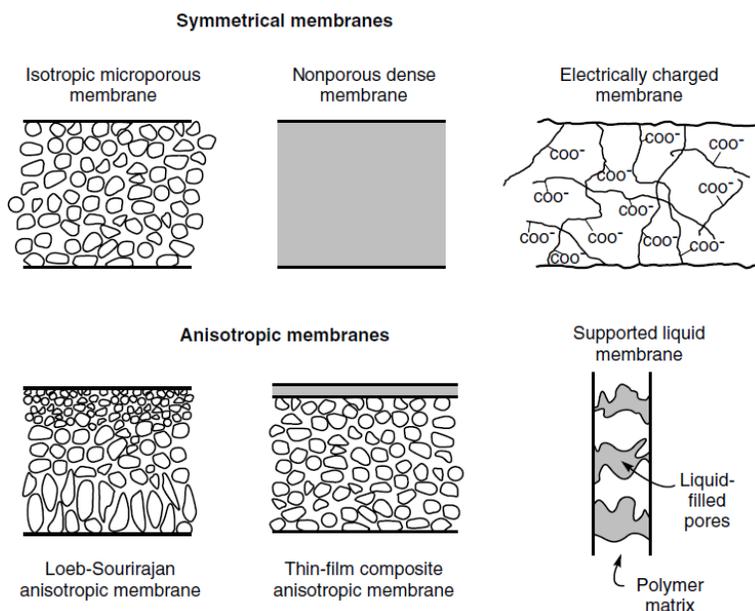


Figure I.46 : Représentation schématique des différents types et structures de membranes.  
Reproduction de Baker (2012) avec autorisation de Wiley.

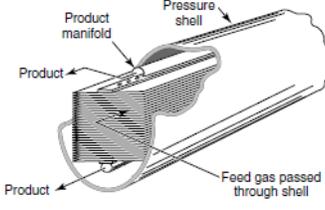
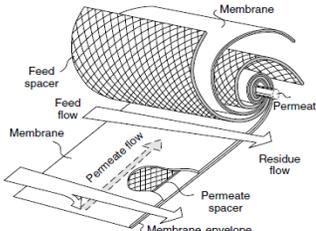
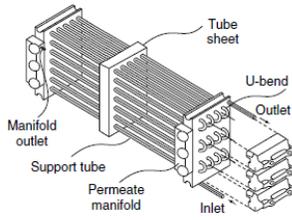
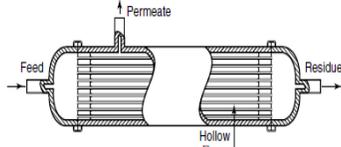
Brièvement, les géométries les plus utilisées actuellement sont les membranes planes, spiralées, tubulaires et à fibres creuses. La géométrie plane comme son nom l'indique, repose sur l'utilisation de membranes sous forme de plaques empilées de manière similaire à un filtre-pressé. Les modules à membrane spiralée, très utilisés en nanofiltration et osmose inverse, consistent en un enroulement cylindrique de couches alternant entre grille de plastique (où circule le rétentat) et membrane, le perméat étant récupéré dans la cavité cylindrique centrale. Surtout utilisés pour les membranes minérales (céramiques ou autres), les modules tubulaires constitués de faisceaux de tubes en parallèle reposent sur une circulation interne du rétentat pour une perméation à travers les faisceaux vers l'extérieur. Enfin, les membranes à fibres creuses, plus compactes permettent de collecter le perméat soit à l'intérieur, soit à l'extérieur des fibres selon les modèles et sont plus adaptées pour les fluides peu visqueux et moins sujets à l'encrassement (Arzate 2008 ; Baker 2012). Dans le cadre de la concentration des extraits d'écorce d'érable à échelle laboratoire pilote, une membrane d'osmose inverse dense, en polyamide et de géométrie spiralée semble adaptée.

#### I.3.3.1.3.3. L'ultrafiltration pour séparer et concentrer des composés phénoliques

Comme explicité précédemment, l'ultrafiltration est un procédé bien adapté aux extraits végétaux tels que ceux de thé et de café et à d'autres boissons comme les jus de fruits. Son utilisation pour séparer le produit initial aqueux en fractions plus ou moins riches en composés phénoliques a déjà été investiguée (Galanakis 2015b). Ainsi, des applications à différentes substances pour tenter de concentrer les molécules phénoliques ont été testées, comme l'ultrafiltration de vin pour séparer les tannins (Rébénaque *et al.* 2015), ou d'extraits de *Ginkgo biloba* pour récupérer des flavonoïdes glycosylés (Rostagno et Prado 2013). Les

applications à des effluents et déchets de procédés agroalimentaires ont aussi été investiguées, tels que les eaux usées de pressoirs à olive (El-Abbassi *et al.* 2014), et les résidus solides issus de la décantation du vin, *winery sludge* (Galanakis *et al.* 2013).

Tableau I.7 : Modules pour membranes dans l'industrie.  
(Arzate 2008 ; Baker 2012 ; Daufin *et al.* 1998)  
Reproductions avec autorisation de Wiley.

	Plane	Spiralée	Tubulaire	Fibres creuses
				
	Organiques (rectangulaires ou disques)	Organiques	Organiques (monotubulaires) Céramiques et autres	Organiques (couche séparatrice interne ou externe)
	Surface $\leq 100 \text{ m}^2$	Surface $\leq 30 \text{ m}^2$	Surface $\leq 25 \text{ m}^2$	Surface $\leq 75 \text{ m}^2$
+	Flexibilité, faible consommation énergétique, membranes accessibles, débit performant, bon échange standard par plaque, réutilisation des plaques.	Compacte, faible volume mort, faible consommation énergétique, coût modéré.	Faible encrassement, nettoyage aisé, échange standard par tube élevé, adapté pour produits visqueux. <b>Céramiques</b> : durée de vie, tenue mécanique, thermostabilité, résistance lavages chimiques, stérilisation à la vapeur.	Compacte, faible volume mort, faible consommation énergétique, coût modéré, bonne tenue mécanique.
-	Faible résistance thermique, encrassement, coût élevé.	Débit peu performant, échange standard par module faible, faible résistance thermique, encrassement, zones mortes, membranes collées, non accessibles, perte de charge, peu adaptée pour produits visqueux.	Volume mort important, forte consommation énergétique, coût élevé. <b>Organiques</b> : faible résistance thermique.	Peu adaptée pour produits visqueux, échange standard par module faible, faible résistance thermique, encrassement.

+ : avantages, - : inconvénients.

L'utilisation de l'ultrafiltration, comme outil de fractionnement et de séparation partielle des composés des extraits d'érable rouge et d'érable à sucre, semble donc pertinente dans le cadre du volet échelle pilote. En effet, selon les résultats présentés par Galanakis (2015b), en utilisant des membranes adaptées (10 à 25 kDa, polysulfone), il est possible d'isoler des anthocyanes monomériques (perméat), des trimères, dimères d'anthocyanes et tannins condensés (rétentat). Pour un MWCO de 1 à 2 kDa, la sélectivité est moins évidente, néanmoins, les acides hydroxycinnamiques (perméat) sont théoriquement séparés des flavonols et anthocyanes (rétentat), en particulier en utilisant des membranes en fluoropolymère, plus hydrophobes que les membranes de polysulfone et donc plus perméables aux composés phénoliques (Galanakis *et al.* 2013). Avantage certain de l'utilisation de membranes de MWCO relativement faible, la simplification de l'analyse des chromatogrammes obtenus en HPLC. En effet, retenir les anthocyanes polymériques (tannins condensés) permet d'éliminer le bruit caractéristique qu'ils induisent dans la ligne de base (déviations de la ligne de base).

Toutefois, la réduction du bruit s'accompagne généralement d'une réduction d'intensité des pics, les composés correspondants étant eux aussi retenus en partie par la membrane (Prodanov *et al.* 2013).

Des conditions optimales d'ultrafiltration, utilisant une membrane tubulaire de 20 kDa en polysulfone, 15 L/min de débit d'alimentation pour un extrait concentré à 1,5%, une température de 50°C et 10 bars ont été rapportées par Jayarajah et Lee (1999). Celles-ci se rapprochent le plus de celles offertes par les équipements à disposition et ont donc servi de base pour la planification de l'ultrafiltration à l'échelle laboratoire pilote pour les extraits d'érable rouge et d'érable à sucre. Des membranes d'ultrafiltration en polysulfone à fibres creuses (perméat récupéré à l'extérieur des fibres) et microporeuses (2 et 30 kDa) ont paru adaptées pour l'application souhaitée.

### **I.3.3.2. Techniques de séchage**

Le séchage est une étape clé dans le conditionnement d'un produit naturel destiné à l'alimentation, mais aussi aux industries pharmaceutiques, cosmétiques, etc. Un produit sec fournit des avantages conséquents en termes de conservation, de stockage ou encore de transport. L'élimination de l'eau ralentit les principales réactions de dégradation et prévient le développement des microorganismes (diminution de l'activité de l'eau).

#### **I.3.3.2.1. Procédés usuels**

La majorité des techniques de séchage se base sur l'application de chaleur par conduction, convection ou radiation pour vaporiser l'eau et ainsi déshydrater le produit à sécher. On peut citer le séchage par infrarouges, par microondes, habituellement couplés à d'autres techniques, le séchage à l'air chaud, ou bien le séchage par atomisation, plus détaillé en section I.2.4.2.2. L'exemple le plus traditionnel reste le séchage à l'air chaud. Bien que cette méthode convective permette un allongement de la durée de conservation du produit pour un coût relativement faible, l'utilisation d'air chaud peut résulter en l'oxydation de composés antioxydants reconnus tels que les polyphénols et les caroténoïdes, également thermosensibles (Ratti 2013). Ainsi, le séchage à l'air chaud a démontré un effet néfaste sur les propriétés antioxydantes de produits de la mangue (Dorta *et al.* 2012). Les hautes températures employées pouvant influencer négativement la qualité d'un produit à sécher, d'autres techniques ont été développées pour préserver les composés thermosensibles. Par exemple, le séchage sous vide, qui peut être mis en œuvre conjugué à d'autres techniques de séchage plus modernes. Particulièrement dans l'industrie agroalimentaire, avec l'utilisation de séchage sous vide assisté par microondes ou par production de plasma. Autre technique, le séchage au CO<sub>2</sub> supercritique qui se base sur l'utilisation du dioxyde de carbone, au-delà des conditions de son point critique (31°C, 7,38 MPa), pour solvater l'eau libre du biomatériau à sécher (Dev et Raghavan 2012). Enfin, procédé considéré comme le plus adapté pour les composés thermosensibles, la lyophilisation se base sur la cryodessiccation du produit à sécher (Ratti 2013).

Les deux prochaines sections ont pour but la présentation de deux techniques de séchage disponibles pour expérimentation à échelle laboratoire pilote : l'atomisation et la lyophilisation. Finalement dans une

troisième section, la technique de lyophilisation par pulvérisation est présentée succinctement, en tant que solution intermédiaire pour produire une poudre sèche, sans utilisation de hautes températures.

### I.3.3.2.2. L'atomisation

Utilisée depuis le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle dans l'industrie laitière, la technique de séchage par atomisation reste à l'heure actuelle une solution prisée pour la production industrielle de poudre standardisée (généralement 10–100  $\mu\text{m}$ ) (Rostagno et Prado 2013). Ayant l'avantage de s'effectuer en une seule étape, cette opération unitaire de séchage permet une production en continu, rapide et à faible coût (Ezhilarasi *et al.* 2013). Basé sur la transformation d'une solution en particules solides sèches, en la pulvérisant à travers un milieu chaud, le séchage par atomisation inclut quatre étapes de base : l'atomisation (ou pulvérisation), le contact du gaz chaud avec les gouttelettes de solution, l'évaporation de l'eau, et la séparation gaz/poudre (Dev et Raghavan 2012). En effet, le but étant l'évaporation rapide de l'eau contenue dans la solution à atomiser, de l'air à haute température circule à co-courant ou contre-courant pour déshydrater les particules pulvérisées, et ainsi transformer la solution aqueuse initiale en poudre sèche (Ishwarya *et al.* 2015). Une représentation simplifiée d'un appareillage d'atomisation à co-courant est figurée ci-dessous (**Figure I.47**).

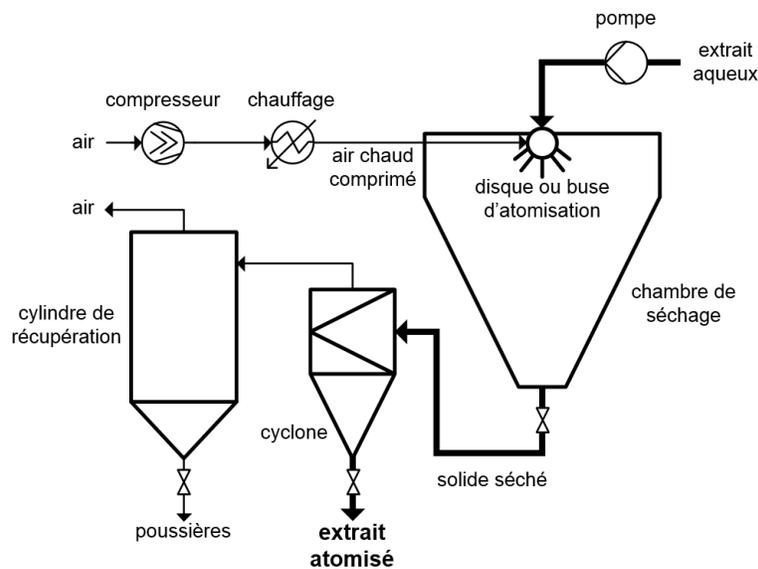


Figure I.47 : Représentation schématique d'un appareillage de séchage par atomisation.

À noter qu'il est aussi possible de réaliser le séchage par atomisation en deux temps. Inclure un lit vibro-fluidisé dans le procédé permet d'améliorer encore l'efficacité du séchage d'un produit. Celui-ci permet de limiter le temps passé par les composés thermosensibles du produit en température, et ainsi, de maximiser la qualité de la poudre obtenue (Dev et Raghavan 2012). Il est vrai que la température est le principal facteur de réduction de l'activité et de la stabilité des composés lors du séchage (et de l'extraction). Elle peut entraîner une dégradation chimique ou enzymatique de l'extrait, une volatilisation de certains composés ou encore une dégradation thermique (Cissé *et al.* 2011 ; Georgetti *et al.* 2008 ; Ishwarya *et al.* 2015). À titre d'exemple, une division par trois de la teneur en phénols totaux, et une réduction de moitié de l'activité antioxydante a

été observée pour un extrait de soja après séchage par atomisation (Georgetti *et al.* 2008). Malgré cette perte de qualité par rapport à un procédé à basse température tel que la lyophilisation, le contrôle de la taille et de la morphologie des particules séchées est possible en utilisant l'atomisation (Ezhilarasi *et al.* 2013). Une optimisation est envisageable en ajustant de manière adéquate les paramètres expérimentaux débit, concentration de la solution, température d'entrée, mode de pulvérisation (buse, disque rotatif...), ajout d'adjuvants de séchage, formulation (microcapsules, microcomposites, micelles, liposomes) (Cuevas Valenzuela *et al.* 2017 ; Rostagno et Prado 2013). Dans le cadre de l'étude des extraits d'érable rouge et d'érable à sucre à échelle laboratoire pilote, les paramètres de séchage ont été basés sur un projet précédent analogue (optimisation du séchage d'un extrait aqueux d'épinette noire). Ces paramètres ont été adaptés pour permettre le séchage des solutions d'extraits produites.

### I.3.3.2.3. La lyophilisation

Comme précédemment évoqué, le séchage par lyophilisation est une autre technique largement utilisée pour obtenir un produit sec de qualité à partir d'un extrait aqueux (ou autre produit requérant une déshydratation). Son avantage majeur sur les autres procédés de séchage, demeure sa mise en œuvre sous vide et à basse température qui permet l'accès à des produits de haute qualité (Rostagno et Prado 2013). À titre d'exemple, la mangue, dont la teneur en eau élevée entraîne une forte propension à la décomposition, conserve de meilleurs taux de phénols totaux, d'acide ascorbique, de caroténoïdes, et de meilleures propriétés antioxydantes (tests ABTS, DPPH, FRAP et ORAC), lorsqu'elle est lyophilisée par rapport aux résultats fournis après séchage sous vide en température, ou encore par infrarouges (Dorta *et al.* 2012 ; Sogi *et al.* 2015).

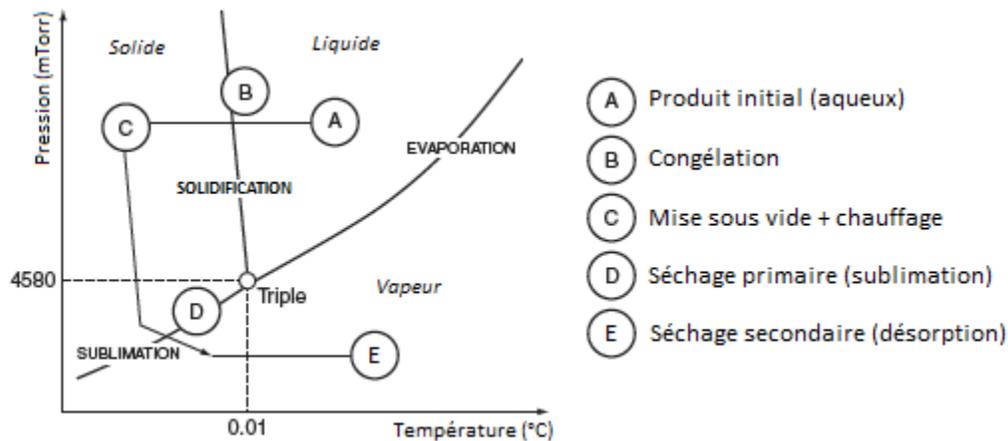


Figure I.48 : Diagramme de phases de l'eau présentant les différentes étapes lors du séchage par lyophilisation. Adaptation de Ratti (2013) avec autorisation de Elsevier.

Le principe de la lyophilisation se résume en quatre étapes clés : une phase de congélation, de sublimation (séchage primaire), de désorption (séchage secondaire), et enfin, la phase correspondant au stockage du produit (Ezhilarasi *et al.* 2013). Une congélation rapide est préférée lors de la lyophilisation. En cause, la formation de petits cristaux de glace au sein de la matrice solide (issus de l'eau libre), qui préservent l'intégrité des cellules du matériau et ainsi sa qualité. À l'inverse, un refroidissement plus lent aura tendance

à former de gros cristaux, abîmant les tissus, mais permettant une sublimation plus efficace, et donc un séchage primaire bien plus rapide. Ceci ouvre la voie à une possible optimisation de l'étape de congélation selon les besoins de l'utilisateur (Ratti 2013). Par la suite, l'étape de séchage primaire consiste en l'élimination de l'eau libre sous forme de glace lors de la sublimation, rendue possible par les faibles pressions mises en jeu. Puis, un séchage secondaire est possible. Comme évoqué, il consiste en un phénomène de désorption correspondant à une simple évaporation sous vide de l'eau liée du produit ne pouvant être congelée (Ishwarya *et al.* 2015). Il est d'ailleurs important, lors de ces deux étapes de maintenir le produit respectivement en deçà de ses températures d'effondrement (*collapse temperature*) et d'effondrement à sec (*collapse of dry material temperature*). Ces températures limites dépendent du matériau à sécher, et peuvent être maximisées pour augmenter la stabilité du produit par utilisation d'additifs *e.g.* du tréhalose (Ratti 2013). Les conditions et étapes de la lyophilisation sont résumées à la **Figure I.48**.

Malgré un gain réel vis-à-vis de la conservation des produits et de la préservation de leurs composés thermolabiles, la lyophilisation s'accompagne d'une durée d'utilisation (> 20 h) et d'un coût énergétique conséquents (Ezhilarasi *et al.* 2013 ; Ishwarya *et al.* 2015). Celui-ci est dû principalement à la mise en œuvre sous vide et à l'énergie nécessaire au refroidissement du condenseur, qui doit isoler la vapeur du produit, en la gardant recondensée sous forme de glace. Outre son caractère énergivore et chronophage, le séchage par lyophilisation présente le désavantage, contrairement à l'atomisation, de ne pas fournir un produit final sec sous forme de poudre, mais plutôt de solide poreux, très hygroscopique. Aussi, dans le souci de réduire la taille des pores, pour obtenir un solide sous forme de poudre, et de réduire le temps de séchage, un procédé alternatif de lyophilisation par pulvérisation a été développé (Ezhilarasi *et al.* 2013).

#### **I.3.3.2.4. Une variante : la lyophilisation par pulvérisation**

Cette technique est très prometteuse pour les domaines liés à la micro-, voire nano-encapsulation, où le séchage d'une micro- ou nano-suspension est nécessaire pour maintenir la stabilité de la structure. Elle fournit une poudre comme par atomisation, avec cependant les mêmes avantages de respect de la qualité du produit que par lyophilisation (Ezhilarasi *et al.* 2013). Consistant en trois phases distinctes, l'atomisation (pulvérisation), la congélation et le séchage, le principe de la lyophilisation par pulvérisation est basé sur l'atomisation d'une solution en gouttelettes, solidifiées par contact avec un fluide froid. Puis, la glace constitutive des gouttelettes est sublimée dans des conditions de faibles température et pression (Ishwarya *et al.* 2015).

Le procédé possède plusieurs dénominations, déterminées selon les conditions mises en œuvre lors des deux principales étapes qui le constituent : la pulvérisation/congélation (*spray-freezing*) et la lyophilisation (*freeze-drying*). Ces différentes variantes du procédé de lyophilisation par pulvérisation sont présentées à titre informatif et de manière synthétique dans le **Tableau I.8**.

Au final, malgré un équipement plus complexe entraînant des difficultés de mise à l'échelle, par rapport aux simples atomisation et lyophilisation, cette technique semble prometteuse. Ses nombreuses variantes permettent une optimisation de la dépense énergétique par rapport à la qualité finale du produit.

Des variantes du séchage par lyophilisation conventionnel existent également à pression atmosphérique ou bien en utilisant un lit fluidisé. Néanmoins, l'étape d'atomisation permet à la technique de lyophilisation par pulvérisation de mettre en jeu de meilleurs transferts de matière, de chaleur, et de produire un matériau d'une meilleure homogénéité (Ishwarya *et al.* 2015 ; Ratti 2013).

Tableau 1.8 : Différentes variantes du procédé de lyophilisation par pulvérisation.  
(Ishwarya *et al.* 2015)

	Étapes du procédé	Principe
Pulvérisation/ Congélation	<i>Spray freezing into vapour</i> (SFV)	Solution à sécher pulvérisée dans un gaz sec à basse température.
	<i>Spray freezing into liquid</i> (SFL)	Solution pulvérisée directement dans un liquide cryogénique (gaz liquéfié : azote, argon, pentane, CO <sub>2</sub> ).
	<i>Spray freezing into vapour over liquid</i> (SFV/L)	Solution pulvérisée dans la zone de vapeur (début de solidification), juste au-dessus du liquide cryogénique en ébullition (solidification complète).
Lyophilisation	<i>Freeze-drying</i> (FD)	Lyophilisation conventionnelle, sous vide.
	<i>Atmospheric spray-freeze-drying</i> (ASFD)	Utilisation d'un gaz sec et froid (air, azote, hélium), comme dessiccant et support du transfert de chaleur nécessaire à la sublimation.
	<i>Atmospheric fluidized bed spray-freeze-drying</i> (AFBSFD)	Gaz pour former un lit fluidisé (vélocité contrôlée pour supporter la masse des particules sans les entraîner dans le courant créé). Transfert de masse et de chaleur maximisés.
	<i>Sub atmospheric spray-freeze-drying</i> (SASFD)	Application d'un vide partiel (environ 0,1 bar) pour minimiser la quantité de gaz nécessaire.
	<i>Sub atmospheric fluidized bed spray-freeze-drying</i> (SAFBSFD)	Même principe que le SASFD. La faible densité du gaz diminue l'entraînement des particules hors du lit fluidisé.

## I.4. Présentation des objectifs de recherche

La revue de littérature présentée dans ce chapitre a permis de dégager certains points clés constituant une problématique. Pour y répondre, une hypothèse de recherche ainsi que des objectifs associés ont pu être formulés.

Dans un contexte favorable de développement de nouvelles sources de bioraffinerie, associé à une richesse des érables en termes de composés hydrosolubles aux propriétés biologiques avérées, ce projet de thèse se concentre sur la valorisation de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre. Les résidus d'écorce de ces deux essences commerciales du Québec sont disponibles en quantités appréciables. D'autre part, l'eau chaude en tant que solvant d'extraction de l'écorce possède un potentiel conséquent pour la bioraffinerie grâce à sa non-toxicité, sa disponibilité et la préservation des composés bioactifs. Les rendements élevés obtenus après des extractions de courtes durées motivent une application à plus grande échelle du procédé pour la récupération d'autres composés hydrosolubles en plus des composés phénoliques déjà étudiés. De ces constats a été déduite l'hypothèse de recherche suivante :

Un procédé d'extraction à l'eau chaude est apte à produire quantitativement des composés phénoliques antioxydants parmi d'autres composés bioactifs pour permettre une valorisation viable de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre. De cette hypothèse découlent les quatre objectifs principaux de la recherche qui sont détaillés ci-après :

- Le premier objectif du projet vise l'optimisation à l'échelle laboratoire du procédé d'extraction à l'eau chaude des écorces des deux essences en termes de rendement en extraits, de teneur en composés phénoliques et de capacité antioxydante, la finalité étant le choix de conditions d'extraction pertinentes pour une mise à l'échelle.
- Le deuxième objectif a pour but la validation à l'échelle laboratoire pilote du procédé d'extraction et le développement d'un procédé complet pour la production efficiente d'extraits secs aux propriétés antioxydantes préservées, ceci en optimisant les opérations unitaires de séparation, de concentration et de séchage.
- Le troisième objectif s'intéresse à la caractérisation de l'extrait d'écorce d'érable rouge par LC-MS et DPPH-HPLC avec pour but d'améliorer les connaissances sur la nature et la quantité en composés extractibles phénoliques produit à échelle laboratoire pilote. Cette approche vise également à renseigner sur d'éventuels effets de matrice au sein de l'extrait brut et déterminer le bien-fondé d'un isolement des composés ou d'un simple fractionnement.
- Enfin, la production de fractions par filtration membranaire à échelle laboratoire pilote est considérée dans un quatrième objectif, le but étant d'évaluer la performance de la technique d'ultrafiltration et de caractériser des macromolécules peu étudiées dans le genre *Acer*.

Pour répondre à chacun de ces quatre objectifs, selon l'ordre logique énoncé ci-dessus, la suite de la thèse a été divisée en quatre chapitres distincts (chapitre 2, chapitre 3, chapitre 4, chapitre 5).

## II. Chapitre 2 – Optimisation à échelle laboratoire de l'extraction à l'eau chaude d'écorce d'érable

Ce chapitre est basé sur un article publié par la revue *Journal of Wood Chemistry and Technology* sous le titre : *Hot-water extraction optimization of sugar maple (Acer saccharum Marsh.) and red maple (Acer rubrum L.) bark applying principal component analysis.*

Cet article, correspondant au mandat initial du sujet de la thèse, met en évidence des différences significatives entre les extraits à l'eau chaude de l'écorce des deux essences d'érables étudiés. L'optimisation des conditions d'extraction de l'écorce à échelle laboratoire, dont le but initial était la récupération et la préservation de composés antioxydants, a permis de sélectionner des paramètres viables pour envisager la suite des travaux à échelle laboratoire pilote.

### *Résumé*

Dans l'industrie forestière, l'écorce est un résidu abondant, le plus souvent incinéré pour la production d'énergie. Le potentiel antioxydant de composés phénoliques de l'écorce de l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) et de l'érable rouge (*Acer rubrum* L.) ayant déjà été mis en évidence, l'étude se concentre sur l'optimisation de l'extraction de tels composés. Différents paramètres (essence d'érable, température et durée d'extraction, ratio écorce/solvant, granulométrie de l'écorce) ont été testés et des différences conséquentes entre les deux essences ont été observées. Le rendement d'extraction, la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante de l'extrait d'érable rouge sont plusieurs fois supérieurs aux valeurs obtenues pour l'extrait d'érable à sucre. Une analyse en composantes principales, appliquée aux huit meilleures conditions d'extraction, a mis en évidence trois à quatre clusters dépendamment de l'essence d'érable. Ces groupes ont pu être classés selon différentes combinaisons de variables réponses : des traitements à hauts rendements et hautes consommations énergétiques combinés aux plus faibles valeurs de teneur en phénols totaux et de capacité antioxydante observées ; à des rendements et consommations énergétiques modérés couplés aux plus hautes valeurs de capacité antioxydante et de phénols totaux.

### *Abstract*

In the forest industry, bark is an abundant residue, predominantly converted into calorific energy. As the antioxidant potential of phenolic compounds from sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark has previously been established, the present study focused on the hot-water extraction optimization of these barks. Several process parameters (maple species, temperature, duration, ratio bark/water, particle size) were thus studied and large disparities were found between the two species. Extraction yield, phenolic content and antioxidant capacity of red maple extracts were several times higher than those of sugar maple extracts. Principal component analysis, applied to the selected best extraction conditions, identified three to four clusters depending on the maple species. These groups were sorted from

the highest extraction yield and energy consumption combined with the lowest phenolic content and antioxidant capacity, to moderate extraction yield and energy consumption with the highest phenolic content and antioxidant capacity.

### ***Shortened title***

Extraction optimization of two maple species bark

### ***Keywords***

sugar and red maple bark, antioxidant capacity, phenolic compounds, hot-water extraction optimization, principal component analysis

## **II.1. Introduction**

Sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) are hardwood species native to eastern North America. Both are known for the quality of their wood and for their sap, producing syrup by boiling for concentration. Maple syrup is well-known for its organoleptic and antioxidant qualities, and has been consumed for a long time by Aboriginal Canadians. In First Nations traditional medicine, bark from red maple in particular, was also widely used (Krochmal *et al.* 1969).

Bark in general is a high volume residue generated by the forest industry, the pulp and paper industry generating globally 100 to 300 kg of bark for each ton of produced pulp (Bajpai 2015). Currently in industry, bark is mainly incinerated to produce calorific energy (Co 2010 ; Harkin et Rowe 1971), despite a rich and valuable chemical composition. Hardwood bark contains 40 to 55% of lignin, 30 to 48% of polysaccharides (cellulose, hemicellulose) and from 2 up to 25% of extractives (Harkin et Rowe 1971). Generally, extractives are defined as substances non-covalently linked to the cell wall (“free” molecules), which are therefore easily extracted from the plant tissues using organic solvents or water (Stevanovic et Perrin 2009). Extractives content is about two times higher in bark than in wood as these substances are originally derived from elaborated sap and can be found in high concentrations in non-living cells of outer bark. Water-soluble extractives consist mainly of simple sugars, pectins, other polysaccharides, peptides (primary metabolites) and phenolic compounds (secondary metabolites) (Harkin et Rowe 1971).

Phenolics are substances exhibiting a great variety of structures. Based on a hydroxyl-mono- or poly-substituted aromatic ring (phenolic functional group), these compounds are wide-spread in the plant kingdom with more than 8000 identified structures. They can be classified as: flavonoids, which include chalcones, flavanones, flavanols and flavones; lignans; coumarins; stilbenes; and phenolic acids (hydroxycinnamic, hydroxybenzoic) and derivatives (gallotannins, ellagitannins, glycoside phenolics...) (Crozier *et al.* 2006).

Numerous functions are attributed to phenolics, such as pigmentation, protection against UV, fungi, insect and herbivores, they can also protect against oxidation (Wei *et al.* 2015). Oxidation is a natural

phenomenon occurring in living organisms caused by reactive oxygen species (ROS). However, an excess of ROS (oxidative stress) can damage cells by free radical mechanisms such as lipid peroxidation, proteins or DNA oxidation (Ziyatdinova *et al.* 2005). These oxidation processes are related to a number of human health issues, such as cardiovascular or degenerative diseases and aging (Royer *et al.* 2011). Antioxidants play a leading role against oxidation, and thus contribute to reduce oxidative stress by free radical scavenging, chelation or additive effect with other antioxidants (Co 2010). Moderate intake of these compounds, naturally present in fruits, vegetables or aromatic plants has been claimed to be beneficial for human health (Bimakr *et al.* 2012 ; Boeing *et al.* 2014 ; Co 2010).

Original phenolic glycosides with antioxidant potential were identified in red maple bark (Yuan *et al.* 2012), as well as in sugar maple bark (Yuan *et al.* 2011), along with some more common phenolics. In addition, extracts of red maple bark showed a large content of phenolic compounds and a potent antioxidant activity. Furthermore, hot-water extracts have been determined to have higher antioxidant activity than ethanolic extracts (for similar total phenolic contents), as hot water produced two times more extractives (Royer *et al.* 2011). Those can include active polar compounds hard to extract with ethanol (less polar than water). Other than phenolics, hot water is also likely to extract efficiently polysaccharides, peptides or proteins (Harkin et Rowe 1971 ; Pranovich *et al.* 2016), susceptible to exhibit bioactivity (Ferreira *et al.* 2015).

Thus, the idea of a process based on sugar maple and red maple bark hot water extraction that could provide a viable source of bioactive molecules including antioxidant phenolics may seem practicable. The availability of this bio-based raw material in significant quantities along with the potential to use hot water as a solvent (cleaner and less harmful than alcohols usually used for biomass extraction), led us to consider the development of a “Green Extraction” process (Chemat *et al.* 2012). This work provides a preliminary study of optimizing extraction parameters at a laboratory scale. Comparisons between extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity are investigated based upon the various extraction conditions and the maple species, *Acer saccharum* (AS) and *Acer rubrum* (AR). The study also aims to consider the potential of hot-water extraction as a “Green Extraction”, at pilot scale level, by the evaluation of energy consumption depending on extraction conditions.

## **II.2. Materials and methods**

### **II.2.1. Material sampling**

Vigorous red maple and sugar maple trees (6 by species) were harvested in December 2014 near St-Antoine-de-Tilly, QC, CA (46°38'40.0"N, 71°35'45.1"W; 46°38'42.2"N, 71°35'48.4"W) and Dégelis, QC, CA (47°30'36.0"N, 68°34'48.0"W). Each tree stem provided two 1 m-long logs (at breast height and at crown height). Lichens and impurities were removed from the logs using compressed air and then, inner and outer bark were collected using a drawknife. Bark samples were air-dried at room temperature for four days

(Gignac 1992), and successively ground in a SC3342 chipper/shredder (Echo BearCat) and milled in a Mikro-Bantam hammer mill (Hosokawa Micron Powder System) to pass a 35 mesh (500  $\mu\text{m}$ ) sieve. Bark particles retained on a 60 mesh (250  $\mu\text{m}$ ) sieve were identified as “medium”, non-retained particles were labelled as “fines”. Medium and fines were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in darkness prior to extractions.

### **II.2.2. Experimental design**

Five distinct extraction parameters were studied, their levels comprising the two maple species (M), three extraction temperatures (T), three bark/water ratios (R), three extraction durations (D) and two particle sizes of the bark (PS), either medium (250–500  $\mu\text{m}$ ) or fines (<250  $\mu\text{m}$ ). Treatments were then arranged in a  $2 \times 3 \times 3 \times 3 \times 2$  factorial experiment. Standard quantitative levels were selected for T ( $60^{\circ}\text{C}$ ,  $80^{\circ}\text{C}$ ,  $100^{\circ}\text{C}$ ), R (1/5, 1/10, 1/20), and D (1 h, 2 h). A qualitative level,  $2 \times 1$  h consisting of the renewal of the solvent after one hour was added to the factor duration (D) (Nitta *et al.* 1999), as sequential extractions could positively influence extraction yield (Pranovich *et al.* 2016). Experimental units were arranged as a split-plot design with a randomization restriction on the factor PS. Two replicates of the experimental units were deemed sufficient according to preliminary study of the experimental variability (two to three replicates only induced a slight decrease of the coefficient of variation from 3.09% to 2.52%) and considering the substantial statistical power induced by the factorial treatment structure.

### **II.2.3. Extractions**

Extractions were performed in 250 mL flasks containing 100 mL of distilled water and 5, 10 or 20 g of bark, depending on the bark/water ratio (R). Extractions at  $100^{\circ}\text{C}$  were performed under reflux using a heating mantle whereas extractions at  $60^{\circ}\text{C}$  and  $80^{\circ}\text{C}$  were performed in a thermostatic bath at the corresponding temperature. The aqueous extracts were separated from the bark particles by filtration on Büchner funnel using Whatman filters No3 (6  $\mu\text{m}$ ). After the first hour of the  $2 \times 1$  h extractions, the volume of filtrate was measured; the same volume of distilled water was added to the filtered extracted bark (in order to maintain the same bark/water ratio) for a second hour of extraction. Extraction yield (EY) was estimated by drying 10 mL of each crude extract at  $105^{\circ}\text{C}$  for 24h and was expressed as the mass ratio of the total dry extract obtained to the initial dry bark. Aqueous extracts were freeze-dried and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in darkness prior to colorimetric assays.

### **II.2.4. Total phenolic content**

Total phenolic content (TPC) of the dried extracts were determined spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method (Scalbert *et al.* 1989): 0.5 mL of diluted extract (140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for sugar maple, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for red maple) was mixed with 2.5 mL of a 10 times-diluted aqueous solution of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and then 2 mL of a 75 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) solution was added. The final mixture was heated at  $50^{\circ}\text{C}$  for 10 min, cooled in an ice bath for 10 min and finally kept at room temperature for another 10 min before reading the absorbance at 760 nm

against a blank (distilled water replacing the diluted extract in the mixture) using a UV-visible spectrophotometer (Varian Cary® 50). Experiments were performed in triplicate and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g).

### II.2.5. Antioxidant capacity

The radical scavenging activity of the red maple and sugar maple bark extracts against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was measured according to the method described by Li, L. *et al.* (2009). The assay was conducted in triplicate, using a UV-visible spectrophotometer (Bio Rad xMark™) in 96-well microplates mixing 100 µL of extract solution with 150 µL of DPPH and then reading the absorbance at 516 nm after 30 min, against a blank (methanol instead of extract solution mixed with DPPH). The scavenging percentage (*Eq II.1*) was calculated as:

$$\%_{\text{scavenging}} = \frac{(A_0 - A_{\text{extract}})}{A_0} \times 100 \quad (\text{II. 1})$$

where  $A_0$  is the absorbance of the blank and  $A_{\text{extract}}$  is the absorbance of the sample (extract with DPPH). Sugar maple and red maple dry extracts were solubilized in methanol to obtain final concentrations of 40 µg/mL and 12 µg/mL respectively. A solution of DPPH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared in methanol (final concentration, 40 µg/mL) and stored at -5°C in darkness before use. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was selected as positive control. Using Trolox for establishing a calibration curve (final concentrations: 50, 40, 30, 20, 10, 5 µmol/L), the scavenging percentage of the maple extracts was determined as Trolox equivalent antioxidant capacity ( $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ ) expressed as µmol Trolox equivalent per gram of dry extract (µmol TE/g).

### II.2.6. Energy consumption (pilot scale)

Preliminary data on scale-up experiments (testing the different parameters for extractions) allowed to evaluate the energy consumption using electrical power and operation time of the equipment involved from extraction to drying. Then, a variable representing energy consumption (*EC*) was established for the comparison of the different extraction conditions (extrapolation of lab extractions at pilot scale). A mixer-emulsifier Scanima A/S SRB-25L (Tetra Pak) was used as the hot water extractor (15 L of water). Steam heating of the extractor was provided by a gas water-tube boiler (Dominion Bridge Co. Ltd). A separator LWA-205 (Westfalia) allowed to centrifuge the extract and remove the bark particles. The remaining particles in suspension were filtrated by a 0.5 µm plate filter press Super Jet (Buon Vino). A filtration unit installed with a reverse osmosis membrane (Filtration Engineering) was used to reduce the aqueous extract volume from 8.4–27.5 L (depending on the bark/water ratio, on the particle size of the bark, and on solvent renewal), to about 2 L. Spray-drying was then performed using a pilot-scale Niro atomizer (GEA Process Engineering) to obtain a dry extract.

$EC$  (kWh per kg) is expressed as energy per unit mass similarly to previous works (El Darra *et al.* 2013 ; Schell et Harwood 1994), and is determined for each extraction condition, using the following formula (Eq II.2):

$$EC = \sum_i \frac{U_i I_i t_i}{m_b} \quad (\text{II. 2})$$

where  $U$  is the input voltage (kvolt),  $I$ , the current intensity (ampere) either measured by clamp ammeter or based on manufacturer data and  $t$ , the effective utilization time (hour), for the different units represented by  $i$  (extractor: vapor feed, stirrer, mixer; separator; filter; reverse osmosis; spray-drying).  $m_b$  stands for the mass of bark (kg) and depends on the bark/water ratio (R).

### II.2.7. Statistical analysis

The following statistical analyses were conducted using SAS software, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). For dependent variables (EY, TPC, TEAC<sub>DPPH</sub>), five-way ANOVA was used to evaluate factor effects and interactions, followed by protected LSD (least significant difference) test to screen main differences between maple species (LSD,  $p < 0.05$ ), but also to thoroughly study differences between treatments and isolate the best extraction conditions (LSD,  $p < 0.01$ ). Principal component analysis (PCA) was then implemented on the complete extraction conditions dataset and cluster analysis (CA) was only applied to selected extracts. Principal component scores were plotted solely for selected extracts using MATLAB software version 8.5.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

## II.3. Results and discussion

### II.3.1. Determination of extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity

In order to evaluate the main differences between *Acer rubrum* (AR) and *Acer saccharum* (AS) bark extracts and assess their overall potential, all extractions treatments were compared. Extracts providing the highest values (letter A) according to LSD test ( $p < 0.05$ ) for each response variable (extraction yield, total phenolic content, antioxidant capacity), were used to produce results presented in **Table II.1**. Regardless of the extraction conditions, highest non-significantly different values were expressed as ranges. The means values over each range were calculated to provide an estimation of the expected maximum extraction yield (EY), total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (TEAC<sub>DPPH</sub>) for both maple species.

The estimation of the maximum extraction yield as determined for red maple bark is 2.7 times higher than for sugar maple, maximum total phenolic content is 1.8 times higher, and antioxidant capacity is 4.1 times higher. Comparing red maple extracts and Oligopin®, a commercial extract from maritime pine (*Pinus pinaster*) bark, total phenolic contents are in the same order of magnitude; nevertheless, antioxidant capacity

of red maple extracts is 3.0 times higher than Oligopin®. These results highlight the great antioxidant potential of the aqueous extract of red maple bark.

Table II.1: Ranges and estimations (means) of the maximum extraction yield, total phenolic content, antioxidant capacity for sugar maple, *Acer saccharum* (AS) and red maple, *Acer rubrum* (AR) bark extracts.

Extracts	Extraction yield (%) <sup>a</sup>	TPC (mg GAE/g)	TEAC <sub>DPPH</sub> (μmol TE/g)
AR (rg)	18.2–20.2	528.8–540.3	5510–6277
(mn)	<b>19.2</b> (1.4)	<b>534.4</b> (4.6)	<b>5738</b> (283)
AS (rg)	6.9–7.3	298.6 <sup>b</sup>	1303–1673
(mn)	<b>7.2</b> (0.3)	<b>298.6</b>	<b>1401</b> (181)
Oligopin®	-	<b>572.9</b> (12.1) <sup>c</sup>	<b>1930</b> (101)

TPC, total phenolic content; TEAC<sub>DPPH</sub>, Trolox equivalent antioxidant capacity; rg, ranges of highest non-significantly different values by LSD test ( $p < 0.05$ , letter A) for best extracts; mn, means over highest non-significantly different values by LSD test ( $p < 0.05$ , letter A) for best extracts; ( ), standard deviations. <sup>a</sup> % (w/w dry bark); <sup>b</sup> for AS only one TPC value is significantly superior to the others by LSD test ( $p < 0.05$ , letter A), <sup>c</sup> (García-Pérez et al. 2010).

It has been reported that total phenolic content, and radical scavenging expressed as activity or capacity can be linked by high correlations (Boeing *et al.* 2014 ; García-Pérez *et al.* 2010 ; Rosales-Castro *et al.* 2015). Particularly, total phenolic content by Folin–Ciocalteu method and antioxidant capacity by DPPH assay are usually strongly correlated as both approaches involve the same mechanism: electron transfer reaction (Boeing *et al.* 2014). Thus, the differences of ratio observed between the two maple extracts for total phenolic content and antioxidant capacity (1.8 vs 4.1) could be explained by the non-selectivity of Folin–Ciocalteu reagent for dosing the phenolic compounds. This reagent is likely to form complexes with aromatic proteins (not necessarily antioxidant), or reducing sugars (Layne 1957 ; Sánchez-Rangel *et al.* 2013). The non-selectivity could explain the antioxidant capacity of AS extracts being lower than expected if they contained such non-antioxidant proteins or sugars. Yet, the satisfactory correlation observed for AS extracts (**Table II.2**), between total phenolic content and antioxidant capacity ( $r = 0.838$ ,  $r^2 = 70.2\%$ ) suggests that the Folin–Ciocalteu assay does quantify antioxidant phenolics. On the contrary, the low correlation between total phenolic content and antioxidant capacity for red maple extracts ( $r = 0.198$ ,  $r^2 = 3.92\%$ ) suggests that other compounds, in addition of phenolics, are responsible for the high antioxidant capacity of AR extracts. Water-soluble antioxidants or synergists such as vitamin C and selenium derivatives, as well as less polar compounds like terpenoids – as the dielectric constant and polarity of the extraction solvent decrease with temperature – might be found in the hot-water extracts of red maple bark in addition to polyphenols (Chen, T. et Wong 2008 ; Shi *et al.* 2009 ; St-Pierre, F. *et al.* 2013).

Considering the non-homogeneity of variances and the substantial certainty for differences between the two species in terms of extraction yield ( $F = 4081$ ,  $p < 0.0001$ ), total phenolic content ( $F = 88\,218$ ,  $p < 0.0001$ ) and antioxidant capacity ( $F = 9254$ ,  $p < 0.0001$ ), the factor maple species (M) was removed from the statistical model. Thus, variables, best extraction conditions and interactions between extraction parameters were studied for each species separately.

Table II.2: Correlations between extraction yield, total phenolic content, antioxidant capacity for sugar maple (AS) and red maple (AR) bark extracts.

Pearson correlation coefficients (r)	Extraction yield	TPC	TEAC <sub>DPPH</sub>
Extraction yield	1.00	0.497 **** (AS)	0.489 **** (AS)
TPC	0.580 **** (AR)	1.00	0.838 **** (AS)
TEAC <sub>DPPH</sub>	0.648 **** (AR)	0.198 ns (AR)	1.00

TPC, total phenolic content; TEAC<sub>DPPH</sub>, Trolox equivalent antioxidant capacity; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; ns, not significant.

Regarding red maple extracts, ANOVA for each variable showed simple or double significant interactions. In particular, for extraction yield, interaction  $R \times D$  (**Figure II.1**) highlights the equivalence of 1 h and 2 h treatments, meaning that 2 h seems less interesting, taking energy and time consumption into account (**Figure II.2**); 1/5 ratio also proves to be inferior. These tendencies are supported by the results for the other variables, total phenolic content and antioxidant capacity where 2 h and 1/5 treatments exhibit the lowest values. In terms of particle size, fines ( $< 250 \mu\text{m}$ ) show higher extraction yield, antioxidant capacity and total phenolic content (1 h,  $2 \times 1 \text{ h}$ ). Antioxidant capacity values are not significantly different for 60°C, 80°C and 100°C treatments. However, 60°C treatments produce lower extraction yield and total phenolic content. For sugar maple extracts, the partitioned analysis of adjusted means and the interpretation of the significant interactions shows the superiority of fines ( $< 250 \mu\text{m}$ ) and the lower values of 1/5 treatments in terms of extraction yield (**Figure II.3**). The same results were established for antioxidant capacity. Regarding the three variables, lower values for 60°C, and similar values for 1 h and 2 h were observed as reported for AR extracts.

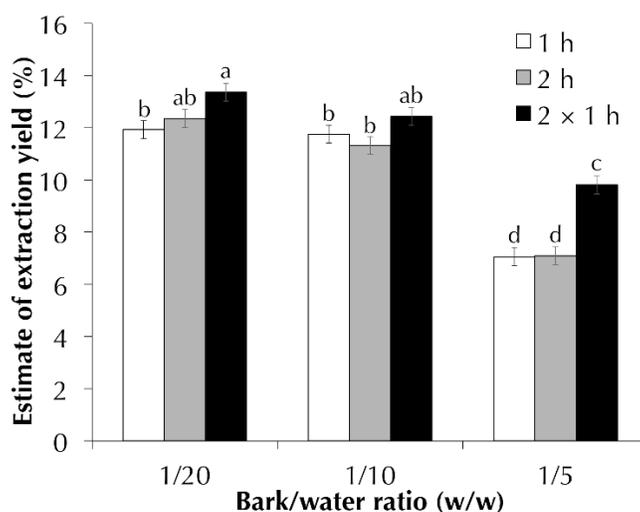


Figure II.1: Interaction  $R \times D$  between factors ratio (R) and duration (D) for the variable extraction yield, *Acer rubrum* (AR) bark extracts. Estimates with same letter are not significantly different (protected LSD,  $p < 0.01$ ).

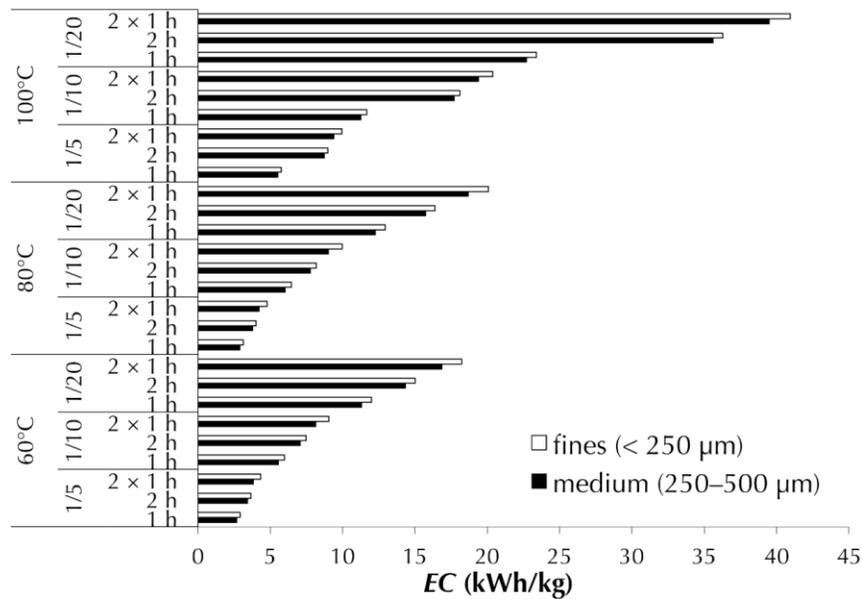


Figure II.2: Energy consumption based on the variable EC for each extraction condition (PS, T, R, D).

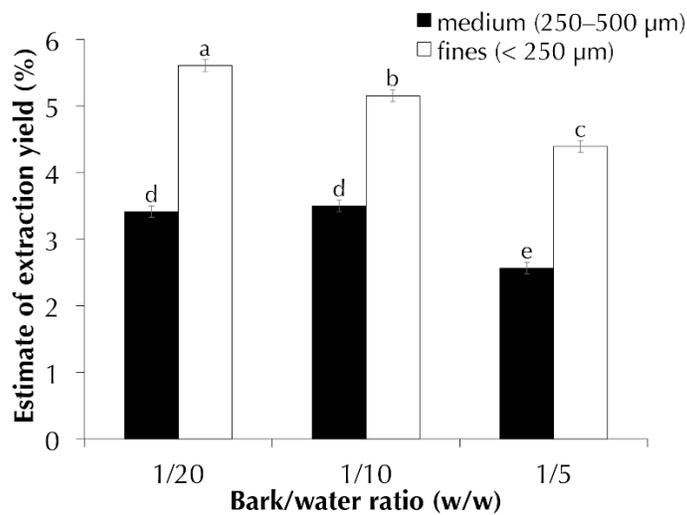


Figure II.3: Interaction  $R \times PS$  between factors ratio (R) and particle size (PS) for the variable extraction yield, *Acer saccharum* (AS) bark extracts. Estimates with the same letter are not significantly different (protected LSD,  $p < 0.01$ ).

In the end, for both maple bark extract, the analysis through ANOVA and multiple comparisons led to discarding the least interesting parameters: medium (250–500 µm), 60°C, 1/5 and 2 h; leaving only eight extraction conditions (**Table II.3**) to be scrutinized by principal component analysis in order to select an optimum extract.

### II.3.2. Estimation of energy consumption

The evaluation of the operation cost of an extraction process, deduced mainly from the energy consumption, is sometimes cited, or even discussed in papers but not necessarily measured nor calculated (Luthria 2012 ; Prasad *et al.* 2009 ; Qu *et al.* 2010). Energy consumption has been taken into account in

previous works, and has been evaluated either by measuring the current used or by using a wattmeter (Nkhili *et al.* 2009 ; Schell et Harwood 1994). Usually, these papers focused on small volumes and on only one aspect of the process, generally the extraction or an extraction-assisting treatment (Boussetta *et al.* 2011 ; Nkhili *et al.* 2009). The comparison of the extraction conditions in terms of energy consumption based on pilot scale data (**Figure II.2**) seemed highly relevant for the optimization of the extraction process.

As it has already been discussed, favoring a low sample/water ratio implies more water usage for the extraction, but also longer and more energy consuming processing during the possible concentration and drying steps (Qu *et al.* 2010). **Figure II.2** highlights this fact and shows a steady increase of *EC* based upon parameters R and D. Similar values are obtained for 60°C and 80°C since the drying step accounts for the main energy cost. For 100°C treatments, maintaining the extraction water at the boiling point induces higher *EC* values, in particular for 1/20 bark/water ratio and 2 h and 2 × 1 h treatments. As fines treatments need more separation and filtration time than medium particles treatments, energy cost is slightly higher.

Data from extraction processes of different natural materials provided energy consumption values in the range of the calculated *EC* values. For instance, the comparison of different extraction techniques of rosemary leaves gave low to medium values: 7.1 kWh/kg using an ultrasonic reactor, 17.9 kWh/kg for heat reflux extraction and 16.2 kWh/kg for microwave-assisted reflux extraction (Jacotet-Navarro *et al.* 2015). Optimized microwave-assisted extraction of green tea needed 41.7 kWh/kg, whereas 10.6 kWh/kg were necessary to perform an optimized pulsed ohmic heating-accelerated extraction of red grape pomace (El Darra *et al.* 2013 ; Nkhili *et al.* 2009). Considering the disparities of extraction techniques and material, and the fact that filtration, concentration and drying steps were not included in these energy cost values, the variable *EC* provides consistent, moderate and potentially useful values for the differentiation of the extracts.

Table II.3: Sugar maple (AS) and red maple (AR) bark extracts selected for principal component analysis.

Extracts	PS (µm)	T (°C)	R (w/w)	D (h)
1	< 250	80	1/10	1
2	< 250	80	1/10	2 × 1
3	< 250	80	1/20	1
4	< 250	80	1/20	2 × 1
5	< 250	100	1/10	1
6	< 250	100	1/10	2 × 1
7	< 250	100	1/20	1
8	< 250	100	1/20	2 × 1

PS, particle size; T, extraction temperature; R, bark/water ratio; D, extraction duration.

### II.3.3. Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) was applied on each maple species separately as a tool to evaluate the differences and similarities between the selected extraction conditions. In addition, cluster

analysis (CA) was performed in order to highlight some patterns in these conditions and simplify the dataset. Furthermore, studying four variables: extraction yield (EY), total phenolic content (TPC), antioxidant capacity (TEAC<sub>DPPH</sub>), and energy consumption (EC) induces complex interpretation of the data. Hence, PCA seemed relevant to reduce EY, TPC, TEAC<sub>DPPH</sub> and EC in only two principal components (linear combinations of these variables) to ease graphical representation and help with the analysis.

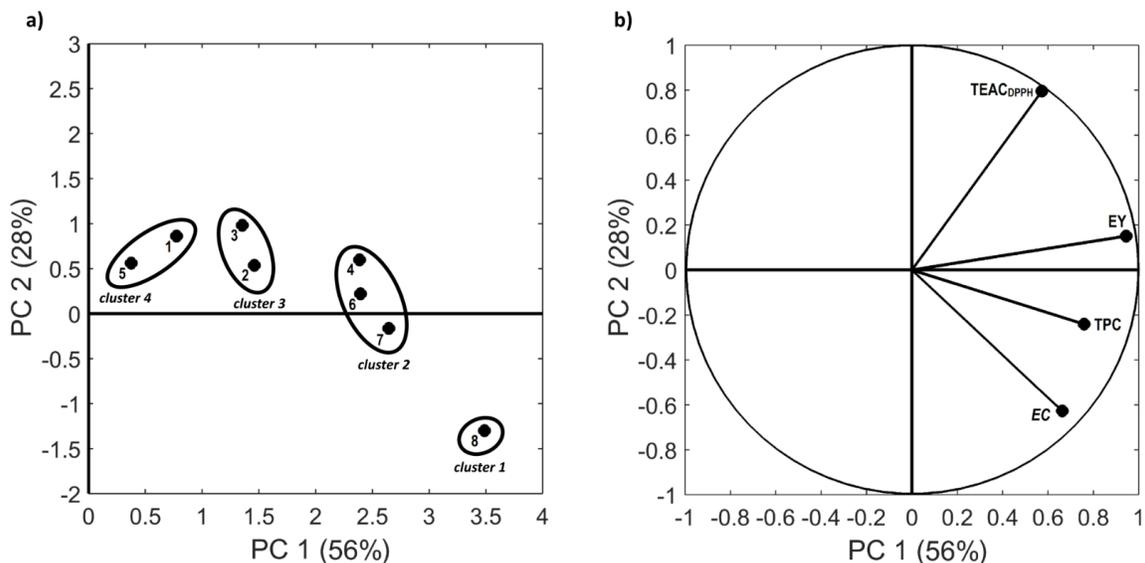


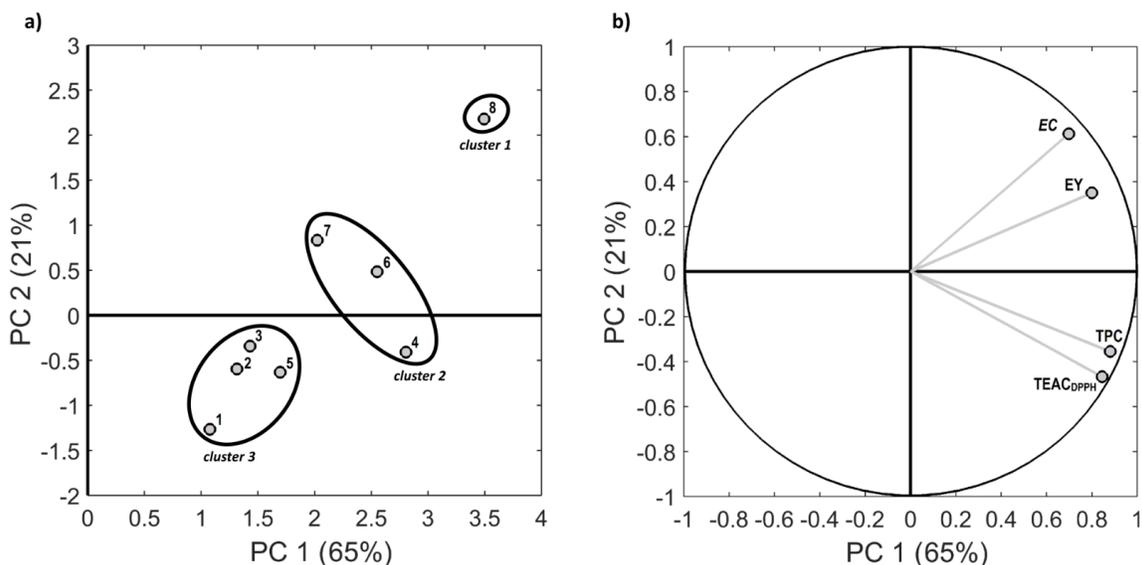
Figure II.4: Scatter plots of first principal component (PC1) versus second principal component (PC2) for selected *Acer rubrum* (AR) bark extracts. a), scores for extraction conditions; b), scores for variables.

For red maple (AR), the first principal component (PC1, horizontal axis) explains 56% of the total variance, PC2 (vertical axis) explains 28% (**Figure II.4**). Therefore, the reduction of four variables into two conserves a total of 84% of information from the original dataset, which was deemed sufficient for the analysis. For sugar maple (AS), PC1 (horizontal axis) explains up to 65% of the variance, while PC2 (vertical axis), 21%, meaning that 86% of the original dataset is explained by the model (**Figure II.5**). While all variables are positively correlated with PC1, other component PC2 was then useful to differentiate the respective influence of EY, TPC, TEAC<sub>DPPH</sub> and EC (**Figures II.4b & II.5b**) on the extraction conditions (**Figures II.4a & II.5a**). For red maple (**Figure II.4b**), variable TEAC<sub>DPPH</sub> is correlated with PC2 ( $p < 0.0001$ ) whereas EC is anti-correlated with PC2 ( $p < 0.0001$ ). The low quality of the projection of TPC and EY on PC2 (*ns*) prevents any interpretation of these variables based upon the vertical axis of **Figure II.4b**. For sugar maple (**Figure II.5b**), EC and EY are correlated with PC2 (respectively,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$ ), while TEAC<sub>DPPH</sub> and TPC are anti-correlated with PC2 (respectively,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$ ).

Concerning extraction conditions (**Figures II.4a & II.5a**) similarities can be highlighted by cluster analysis based on Euclidean distances. The optimal number of clusters was determined using Calinski–Harabasz pseudo-*F* index and Duda–Hart pseudo-*T*-squared statistics (StataCorp 2013 ; Wilkinson *et al.* 1998). Four clusters were spotted for AR: cluster 1 (extract 8), cluster 2 (extracts 4–6–7), cluster 3 (extracts 2–3), cluster 4 (extracts 1–5) as highlighted on **Figure II.4a**. Meanwhile, three clusters were found for AS:

cluster 1 (extract 8), cluster 2 (extracts 4–6–7), cluster 3 (extracts 1–2–3–5) (**Figure II.5a**). Despite few disparities based upon the influence of the variables, clusters for the two maple species are quite similar.

The analysis of both **Figures II.4 & II.5** shows that for red maple and sugar maple, cluster 1 (extract 8, maximizing T and minimizing R c.f. **Table II.3**) is far apart from the other clusters and exhibits relatively high EY and EC (on both horizontally PC1 & vertically PC2). Cluster 2 (extracts 4–6–7) seems more optimal, showing a slightly lower influence of EY and EC (on both PC1 & PC2), but more interesting TPC and TEAC<sub>DPPH</sub> values (on PC2), especially extract 4, for both species. Concerning AS (**Figure II.5**), cluster 3 (extracts 1–2–3–5) exhibits the best TPC and TEAC<sub>DPPH</sub> (on PC2), especially extract 1. This cluster seems to show a little less EY than other clusters, but it also minimizes EC (on both PC1 & PC2), providing an interesting option for a green extraction process. For AR (**Figure II.4**), cluster 3 (extracts 2–3) and cluster 4 (extracts 1–5) seem to display high values of TEAC<sub>DPPH</sub> (on PC2) and the lowest EC values (on both PC1 & PC2). Cluster 3 (extracts 2–3) is more potent in terms of EY (on PC1) and could represent a decent compromise in the choice of red maple extraction conditions.



*Figure II.5: Scatter plots of second principal component (PC1) versus third principal component (PC2) for selected *Acer saccharum* (AS) bark extracts. a), scores for extraction conditions; b), scores for variables.*

Within clusters, similarities are not explained by one factor in particular, but some patterns in the interactions between parameters can be highlighted by referring to **Table II.3**. For cluster 3 (extracts 2–3) and cluster 2 (extracts 4–6–7), proximity between 80°C extracts 2 (1/10, 2 × 1 h) and 3 (1/20, 1 h) can also be observed considering 100°C extracts 6 (1/10, 2 × 1 h) and 7 (1/20, 1 h), showing an interdependence between these particular levels of parameters R and D. Thus, the gap of EY and EC between the two clusters seems mainly caused by factor T. Within cluster 2 (extracts 4–6–7), similarities between 4 (80°C, 1/20) and 6 (100°C, 1/10) seems to be caused by a counterbalance of the T and R levels, whereas the similarity of 4 (80°C, 2 × 1 h) and 7 (100°C, 1 h) results from the combination of T and D levels. Finally, for cluster 4 (extracts 1–5), proximity seems to be due to levels 1/10 and 1 h of factors R and T, commonly shared by both extracts.

While surface response applications are generally aiming for a unique and optimum extraction condition (Bimakr *et al.* 2012 ; Kim *et al.* 2014), this PCA/clustering approach allows more adaptability. Differentiating the extraction conditions graphically, then clustering the data into groups based upon the influence of the studied variables (EY, TPC, TEAC<sub>DPPH</sub>, EC) grant the user more flexibility for selecting a realistic condition for a scale-up. Depending on the preference for EY/EC (extract quantity and energy requirements) vs TPC/TEAC<sub>DPPH</sub> (overall extract quality), the decision can be made inter-cluster. Thereafter, the pilot capabilities for implementing the process can dictate the choice of a suitable extraction condition within the selected cluster (intra-cluster).

## **II.4. Conclusions**

The previously uninvestigated comparison of hot-water extracts of red maple and sugar maple bark demonstrated the superiority of red maple in terms of extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity. Despite those differences, pertinent extraction conditions were identical for both maple species as 60°C temperature, 1/5 bark/water ratio and 2 h duration parameters were removed from the model. Principal component analysis brought on the clustering of these conditions in a similar fashion for red maple and sugar maple. 80°C 1/20 2 × 1 h, 100°C 1/10 2 × 1 h and 100°C 1/20 1 h fines extractions provided satisfactory values for each target variable. Remaining 80°C extractions and 100°C 1/10 1 h were slightly more potent in terms of total phenolic content and antioxidant capacity while exhibiting lower extraction yield and energy consumption. On the other hand, 100°C 1/20 2 × 1 h provided the lowest total phenolic content and antioxidant capacity combined with the highest extraction yield and energy consumption.

Accordingly, these results were useful as a starting point for the development of a large-scale process for the production of the extracts. The “Green Extraction” aspect of the process seemed consistent with all selected extraction conditions, perhaps with the exception of the more yielding/energy consuming extraction condition (100°C 1/20 2 × 1 h).

### ***Acknowledgments***

The authors are grateful to Mr. Clermont Levasseur for assistance with plant authentication; Ms. Sarra Hattab and Mr. Alex Simard for their help during sampling; Dr. Shyam Suwal and Mr. Yves Bédard for scientific and technical advice; and Mrs. Hélène Crépeau and Mr. David Emond for statistical analyses support.

### ***Funding***

The authors are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Levaco Inc. and Decacer Inc. for financial support.

### **III. Chapitre 3 – Optimisation d’un procédé de production d’extraits d’écorce d’érable comme source de composés antioxydants, phénoliques et glucidiques**

Ce chapitre est basé sur un article publié par la revue *Chemical Papers* sous le titre : *Process optimisation for pilot-scale production of maple bark extracts, natural sources of antioxidants, phenolics and carbohydrates.*

Les résultats discutés dans cet article ont montré l’importance d’autres familles de molécules, mis à part les composés phénoliques, au sein de l’écorce des érables rouge et à sucre. Les glucides en particulier (sucres simples, sucrose, oligo- et polysaccharides) semblent être à même de constituer un volet de valorisation pour l’écorce d’érable à sucre, moins riche en composés phénoliques. Les informations fournies dans l’article par test de la teneur en phénol totaux, établissant l’influence des procédés sur les composés phénoliques dans leur globalité sont complétés par une partie « Analyses complémentaires » en fin de chapitre. Les profils phénoliques des deux érables obtenus par chromatographie liquide sont comparés et l’influence des procédés sur les composés phénoliques de l’érable rouge est détaillée plus avant.

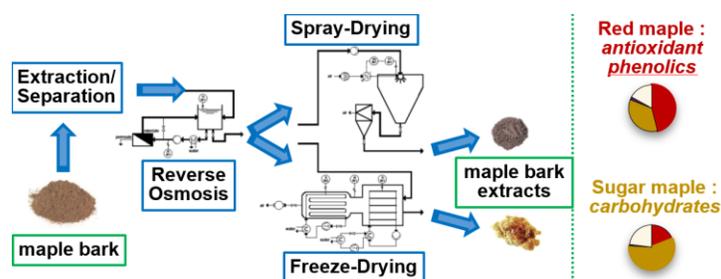
#### ***Résumé***

La demande croissante des consommateurs en additifs alimentaires sûrs encourage l’industrie agro-alimentaire à explorer de nouvelles sources de composés bioactifs. Par ailleurs, l’expansion actuelle de procédés de production plus respectueux de l’environnement souligne l’intérêt de l’extraction à l’eau de sous-produits de plantes et de bois. Des études récentes ayant déjà mis en évidence les propriétés biologiques des extractibles de l’écorce d’érable, cet article s’intéresse aux conditions d’une production efficace et durable, en tant qu’additifs alimentaires, des extraits à l’eau chaude d’écorce d’érable rouge et d’érable à sucre. Plusieurs méthodes d’obtention des extraits ont été testées en évaluant la qualité finale des extraits (capacité antioxydante, teneurs en composés phénoliques, en glucides, en protéines), le rendement et la consommation énergétique du procédé. L’optimisation des étapes de concentration et de séchage par analyse en composantes principales a dégagé deux variantes optimales du procédé. Il a été établi que l’osmose inverse couplée à la lyophilisation maximise la qualité de l’extrait. En outre, lorsqu’elle est couplée à l’atomisation, l’osmose inverse minimise la consommation énergétique et permet une qualité d’extrait acceptable. Les extraits d’érable obtenus par osmose inverse/lyophilisation donnent des valeurs d’ORAC et d’EC<sub>50</sub> DPPH• modérées voire élevées en comparant avec les valeurs d’additifs alimentaires reconnus. Ces extraits semblent donc appropriés pour la production d’aliments enrichis en antioxydants. Une répétabilité satisfaisante entre les procédés de production des extraits d’écorce des deux essences d’érable a été observée en dépit de leurs compositions chimiques différentes. Par conséquent, ce travail pourrait constituer un point de départ pertinent pour étudier l’extraction à l’eau chaude d’écorces d’autres essences ou bien d’autres types de biomasse, ainsi que les traitements optimaux pour la production d’extraits secs.

## Abstract

The growing customer demand in safer food additives lead the food industry to investigate new sources of bioactive compounds. Additionally, the need for “greener” production processes makes aqueous extractions of by-products from plant or wood processing increasingly attractive. Based on recent studies demonstrating the biological properties of the constituents from maple bark, this paper investigates sustainable ways of efficiently producing red and sugar maple bark extracts (RMBE, SMBE) as antioxidant food additives. Several ways to obtain dried extracts were investigated considering the final quality of the extracts (antioxidant capacity, total phenolic, sugar and protein contents), the extract recovery and energy consumption of the process. Optimising the concentration and drying steps using principal component analysis provided two optimal variants of the process. Reverse osmosis/freeze-drying appeared to maximise extract quality while reverse osmosis/spray-drying allowed the lowest power consumption for a sufficient quality. Optimal extracts from both species provided moderate to high ORAC and  $EC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$  values compared to recognised natural food additives confirming their interest for antioxidant enrichment. Considering the favourable repeatability between pilot-scale production processes for RMBE and SMBE despite their distinct chemical profiles, this study could provide a decent basis to investigate the optimal processing of other water-extractable materials.

## Graphical abstract



## Keywords

maple bark extract, antioxidant, food additive, process optimisation, principal component analysis

## III.1. Introduction

Antioxidants and phenolic compounds in particular are substances well known for limiting or even preventing oxidation processes. In living organisms, these naturally occurring mechanisms involving reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) can be excessive causing what is referred to as “oxidative stress” implying possible lipid peroxidation, oxidation of proteins, or even DNA oxidation (Foti 2007 ; Pinchuk *et al.* 2012). Overwhelming evidences have been found of the importance of ROS and RNS in aging and pathogenesis processes (Ou, B. *et al.* 2001). On the other hand, it has been proved that the consumption of sources of phenolic antioxidants such as fruits and vegetables significantly reduces the risks associated to

cancer and cardiovascular diseases (Foti 2007 ; Valls *et al.* 2016). Apart for their health benefits, antioxidants are also added in foods to prolong shelf life by limiting lipid oxidation and its detrimental consequences on food quality (Maqsood *et al.* 2012 ; Pinchuk *et al.* 2012).

Due to food safety concerns pointed by consumers and growing environmental awareness, synthetic antioxidants tend to be progressively set aside and alternatives from natural sources gains more and more recognition for their sustainability. To meet the demands of this increasing market, researchers invest a lot of energy to find such “virtuous” antioxidants (Dorta *et al.* 2013 ; Maqsood et Benjakul 2013 ; Pinchuk *et al.* 2012). Valuable food antioxidants can be obtained through biorefinery by valorising food by-products and co-products, as well as various plant residues from fruit or wood processing industries (Chemat *et al.* 2012 ; Dorta *et al.* 2013 ; El Darra *et al.* 2013 ; Maqsood et Benjakul 2013 ; Rupasinghe *et al.* 2016 ; Widsten *et al.* 2014). Apart from their use as preservatives, for instance in meat and fish products (Bouarab-Chibane *et al.* 2017 ; Maqsood *et al.* 2012 ; Maqsood et Benjakul 2013 ; Widsten *et al.* 2014), these natural antioxidants can exhibit remarkable bioactive potentials, justifying in the case of antioxidants from foodstuffs and food products direct applications as nutraceuticals (Zhang, Y. *et al.* 2014). In fact, antioxidant food additives are often found associated with other biological properties *e.g.* anti-microbial, anti-cancer, anti-inflammatory or anti-diabetic activities (Ma *et al.* 2016 ; Miguel *et al.* 2014 ; Park *et al.* 2017 ; Rupasinghe *et al.* 2016 ; Valls *et al.* 2016 ; Widsten *et al.* 2014). Traditionally, antioxidant as well as other biological activities in natural products are mainly investigated in the form of pure compounds (Geoffroy *et al.* 2017c ; Ma *et al.* 2016). However, due to possible synergistic mechanisms (Foti 2007), studying the potential of extracts or extract fractions as *totums* is becoming increasingly popular (Maqsood *et al.* 2012 ; Miguel *et al.* 2014 ; Rupasinghe *et al.* 2016 ; Valls *et al.* 2016 ; Zhang, Y. *et al.* 2014).

Therefore, efficient and sustainable biorefining processes for the production of such extracts as potential bioactive food additives or nutraceuticals are currently under investigation (Chemat *et al.* 2012 ; Dorta *et al.* 2013 ; El Darra *et al.* 2013 ; Kuck et Noreña 2016 ; Nguyen *et al.* 2016). One concern being to obtain an optimal product through concentration (*e.g.* membrane filtration by microfiltration, ultrafiltration, reverse osmosis, or evaporation) and drying (*e.g.* air drying, sun drying, spray-drying, freeze-drying) steps. To concentrate extracts with minimal loss of product, evaporation is often preferred in the pharmaceutical industry. This conventional technique is based on the vaporisation of the solvent under decreased pressure and/or increased temperature. Reverse osmosis represents a more recent alternative based on a non-vacuum and moderate-temperature principle of semi-permeation and is usually applied in the food industry for juice concentration (Martín *et al.* 2013 ; Schuck *et al.* 2015). To remove the remaining solvent, the most popular techniques for food applications are spray-drying and freeze-drying. The later is know to meet the challenge of preserving thermolabile components by sublimation of the solvent at low pressure and temperature while spray-drying is based on fast solvent evaporation by its atomisation at high temperature (Ishwarya *et al.* 2015 ; Martín *et al.* 2013). Although recent approaches combining both principles and labelled as spray-freeze-drying showed promise by producing high-quality powders, current limitations make industrial applications difficult (Ishwarya *et al.* 2015). Despite, the extensive literature involving such unit operations, applied studies on the whole processing of natural bioactive extracts, especially integrating large-scale, optimisation,

economic and environmental considerations are of limited occurrence (Pérez-López *et al.* 2014). Therefore, there is room for thorough investigations of production processes based upon those considerations.

For the past few years, maple products as well as their constituents have been thoroughly scrutinised searching for biological activities. Maple syrup has been extensively studied for its phenolic compounds and carbohydrates (St-Pierre, P. *et al.* 2014 ; Sun *et al.* 2016 ; Zhang, Y. *et al.* 2014). Studies on bark, leaves and buds of red maple (*Acer rubrum* L.) and sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) provided information regarding highly potent phenolic glycosides including galloyl derivatives specific to the genus *Acer* and their biological properties (Ma *et al.* 2016 ; Meda *et al.* 2017b ; Park *et al.* 2017 ; Yuan *et al.* 2011). Based on the traditional use of bark infusions in Aboriginal Canadian folk medicine and these recent achievements, the extraction of antioxidants from red and sugar maple bark using hot water has been optimised at lab scale (Geoffroy *et al.* 2017a).

The current study is aimed at providing more data about this extraction process and its relevance from an industrial perspective. To this end, the process was scaled-up, and the problematic of extraction widened to every steps involved in the production of the dried red maple and sugar maple bark extracts. Aiming for a safe, realistic and economical process, special emphasis was put on the comparison and optimisation of the pilot-scale unit operations chosen for the concentration and drying steps (vacuum evaporation, reverse osmosis, freeze-drying, spray-drying). The chemical composition and recovery of the extracts as well as the energy consumption of the process were assessed for optimisation purposes. The optimal dried maple extracts were then evaluated in terms of ORAC and EC<sub>50</sub> DPPH• values for comparison with other potential food additives.

## III.2. Experimental

### III.2.1. Samples and reagents

Bark samples were collected in December 2014 from red maple (*Acer rubrum* L.) trees, 71 years old average and sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) trees, 81 years old average. Red and sugar maple trees were harvested near St-Antoine-de-Tilly, QC, CA (46°38'40.0"N, 71°35'45.1"W; 46°38'42.2"N, 71°35'48.4"W) and Dégelis, QC, CA (47°30'36.0"N, 68°34'48.0"W), respectively. After removal of impurities, air-dried bark samples (four day, r.t.) were cyclically ground and sieved to produce “medium” particles (**Figure III.1**), able to pass through a 35 mesh (500 µm) sieve but retained by a 60 mesh (250 µm) sieve as fully described by Geoffroy *et al.* (2017a). The low humidity of bark particles (7.5% w/w) and the several steps of grinding using grids of decreasing sizes allowed for short processing times and moderate heating, maximising the preservation of bioactive compounds.

HPLC grade methanol, acetone, sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), phenol, as well as coomassie (Bradford) assay reagent and bovine serum albumin (BSA) standard ampules were purchased from Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA. Folin-Ciocalteu reagent, 6-hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-azobis (2-aminopropane dihydrochloride) (AAPH), fluorescein and ascorbic acid, galactose, fructose, rhamnose and arabinose standards were purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Oligopin® standard was kindly provided by DRT (Purextract), Dax, France. DPPH<sup>•</sup> methanolic solutions were prepared daily and stored at 4°C in darkness. Deionised water was prepared using a Nanopure Diamond water purification system (Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA, USA).

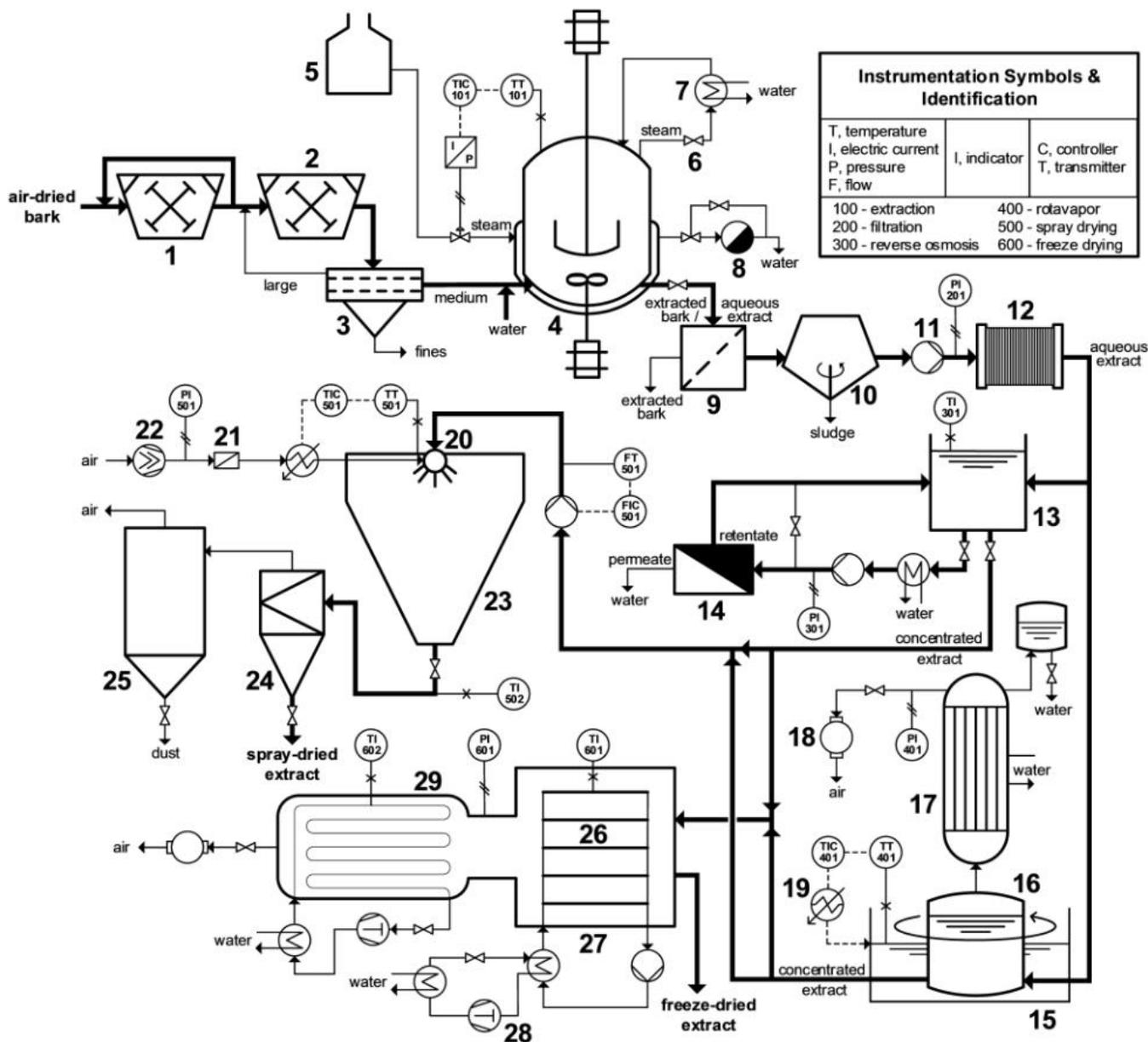


Figure III.1: Schematic diagram showing apparatuses and unit operations for red maple bark extract production processes.

1, 2, hammer mills; 3, sieve shaker; 4, extraction reactor (with stirrer and mixer); 5, boiler; 6, valve; 7, heat exchanger; 8, steam trap; 9, filter; 10, centrifugal separator; 11, pump; 12, plate filter press; 13, feed tank; 14, reverse osmosis membrane; 15, thermostatic water bath; 16, flask; 17, water refrigerant; 18, vacuum pump; 19, heater; 20, rotary disc atomiser; 21, air filter; 22, screw compressor; 23, drying chamber; 24, cyclone; 25, bin; 26, shelves; 27, drying chamber; 28, reciprocating compressor; 29, ice condenser.

### **III.2.2. Unit operations of the process**

The whole red maple bark extract (RMBE) production process is displayed as a schematic diagram on *Figure III.1*. Extractions of red maple bark were performed using a mixer-emulsifier Scanima A/S SRB-25 L (Tetra Pak, Sweden), steam-heated by a gas water-tube boiler (Dominion Bridge Co. Ltd, Canada). 1.5 kg of medium particles and 15 L water were mixed at 90°C for 1 h (Geoffroy *et al.* 2017c). After extraction, coarse pre-filtration allowed to rinse medium bark particles with 90°C water. The crude extract was then centrifuged with a separator LWA-205 (GEA Westfalia, Germany) to remove bark particles. A supplementary filtration step with a 0.5- $\mu$ m plate filter press Super Jet (Buon Vino, Canada) removed the remaining particles. In order to concentrate the extract, two techniques have been explored. Reverse osmosis (RO) was performed on a filtration unit (Filtration Engineering Co., Inc., MN, USA) installed with an AG-1218 membrane (GE Power & Water, NY, USA). Vacuum evaporation (VE) was implemented on a 20-L Rotavapor R-153 (Büchi Labortechnik AG, Switzerland). The concentrated extract was dried either by spray-drying (SD) using a pilot-scale Niro Atomizer (GEA Process Engineering, Denmark) or by freeze-drying (FD) with a Virtis Ultra 25 EL Pilot Lyophilizer (SP Scientific, PA, USA).

### **III.2.3. Experimental design**

In order to optimise the RMBE production process, two factors were studied: concentration (C) and drying (D). Treatments were arranged in a simple  $2 \times 2$  factorial experiment and then investigated as four combinations of unit operations: vacuum evaporation/spray-drying (VE/SD), vacuum evaporation/freeze-drying (VE/FD), reverse osmosis/spray-drying (RO/SD) and reverse osmosis/freeze-drying (RO/FD). Extraction and separation steps were shared by these four treatments (post-extraction processes) and therefore, they were not considered in the experimental model. Two replicates of the experimental units (completely randomized design) were performed in order to provide an estimation of the experimental variability.

Following the investigation of RMBE process, the satisfactory repeatability was supported by using four replicates and a randomized complete block design for sugar maple bark extract (SMBE) but only applying RO/SD and RO/FD treatments. For each experiments, six response variables were studied: antioxidant capacity, phenolic content, sugar content and protein content of the extracts produced, extract recovery, and energy consumption of the different processes.

### **III.2.4. Response variables**

#### *Antioxidant capacity*

Antioxidant capacity assay was performed similarly as described in a previous study from our laboratories (Geoffroy *et al.* 2017a). DPPH<sup>•</sup> scavenging capacity of the maple bark extracts was determined using a microplate UV-visible spectrophotometer (Bio-Rad xMark<sup>TM</sup>, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) as

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup>). 100 µL of red maple extract in water (final concentrations of 12 µg/mL, respectively) was mixed with 150 µL of methanolic DPPH<sup>•</sup> (final concentration of 40 µg/mL). The same procedure was applied to sugar maple extract (40 µg/mL final concentration). Absorbance was read at 516 nm after 30 min against a blank (extract solution replaced by water). A calibration curve of Trolox ( $y = 0.019x + 0.027$ ,  $r^2 = 0.993$ ) in the range of 5–50 µmol/L (final concentration) was used to express the results as µmol Trolox equivalent per gram of dry extract (µmol TE/g).

#### ***Total phenolic content***

Total phenolic content (TPC) was estimated spectrophotometrically by the Folin–Ciocalteu method with some modifications (Scalbert *et al.* 1989). 0.5 mL of aqueous extract (red maple: 80 µg/mL, sugar maple: 140 µg/mL), 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent in water (1/10, *v/v*) and 2 mL of aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were mixed. This mixture was heated 10 min at 50°C, cooled for 10 min in an ice bath and then kept 10 min at room temperature. Absorbance was read at 760 nm against a blank (mixture with water instead of extract) on a UV-visible spectrophotometer (Varian Cary® 50, Agilent, CA, USA). Results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g) using gallic acid to establish a standard curve ( $y = 0.112x$ ,  $r^2 = 0.999$ ).

#### ***Total sugar content***

Total sugar content (TSC) was determined spectrophotometrically (Varian Cary® 50, Agilent, CA, USA) via the phenol-sulfuric acid method (Cui et Brummer 2005) with some modifications. 0.5 mL of 4% (*w/v*) aqueous phenol solution was added to 1 mL of RMBE or SMBE diluted in water (100 µg/mL) and then mixed with 2.5 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After 10 min in darkness, the reaction was stopped by cooling the mixture 20 min in an ice bath. Following 10 min at room temperature, absorbance of the mixture was measured at 490 nm and converted in mg of galactose fructose rhamnose arabinose equivalents per gram of dry extract (mg GFRAE/g), using an equimolar mixture of these four sugars as standard (calibration curve:  $y = 0.010x + 0.022$ ,  $r^2 = 0.996$ ).

#### ***Protein content***

Protein content (PC) was measured by Bradford assay (Bradford 1976), adapted to 96-well microplate. 5 µL of aqueous RMBE or SMBE (22.5 mg/mL) was incubated for 10 min in the dark with 250 µL Coomassie reagent. After removing air bubbles, absorbance was read at 595 nm on a microplate spectrophotometer (Bio-Rad xMark™, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Absorbance values were subtracted by those of blank samples (extract replaced by water). Samples for which Coomassie reagent was replaced by water confirmed that extracts do not absorb at the wavelength studied, limiting potential bias. Using BSA to produce a standard curve ( $y = -0.356x^2 + 1.024x$ ,  $r^2 = 0.999$ ), PC values were expressed as mg of bovine albumin equivalent (BSAE)/g of dry extract.

### ***Extract recovery and energy consumption***

Extract recovery (ER) was calculated as the ratio between the quantity of extract recovered at the end of the process (after concentration and drying steps) and the quantity yielded after extraction and separation steps. For the later value, 10 mL of each crude extract was dried at 105°C for 24 h, the mass obtained was then extrapolated to the total volume of crude extract obtained after bark removal. The amount of extract recovered at the end of the processes was estimated by simply weighing the dry extracts produced.

A calculated variable for energy consumption (*EC*) was established in order to estimate the energy contribution of the different unit operations and the overall value for each process studied. Similarly to previous works, *EC* was based on consumed gas and electrical energy (Nguyen *et al.* 2016), and expressed as energy per unit mass (El Darra *et al.* 2013 ; Geoffroy *et al.* 2017a), according to the following formula (*Eq III.1*):

$$EC = \sum_i \frac{U_i I_i t_i}{m_b} \quad (\text{III. 1})$$

For the different unit operations (*Figure III.1*) represented by *i* (extractor: vapor feed, stirrer, mixer; separator; plate filter; rotavapor or reverse osmosis unit; spray-dryer or freeze-dryer), *U* is the input voltage (kvolt), *I*, the current intensity (ampere) either measured by clamp ammeter or based on manufacturer data and *t*, the effective utilisation time (hour). *EC* is obtained by normalising the calculated energy value by *m<sub>b</sub>*, the mass of bark (kg) used for the extraction.

### **III.2.5. Antioxidant potential of the optimal maple extracts**

In order to better assess RMBE and SMBE in terms of antioxidant values compared to other potential food additives, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and EC<sub>50</sub> (half-maximal effective concentration) towards DPPH• free radical were determined for RO/FD extracts from both maple species.

#### ***Oxygen radical absorbance capacity***

ORAC values of RMBE, SMBE, Oligopin® and ascorbic acid were measured using a Fluostar Galaxy fluorometer (BGMLabTech, NC, USA). Trolox was selected as control in order to produce a standard curve (6.25, 12.5, 25, 50 µM in phosphate buffer, pH 7.0). Similarly as (Bazinet *et al.* 2009), samples were suspended in acetone/water/ acetic acid (70%/29.5%/0.5%) to attain final concentrations of 2.2 µg/mL for RMBE, 6.1 µg/mL for SMBE, 1.7 µg/mL for Oligopin® and 5.2 µg/mL for ascorbic acid. Twenty microliters of each sample solution was added to 200 µL of a 0.036 µg/mL fluorescein solution (in phosphate buffer, pH 7.0) in wells of the apparatus kept at 37°C. AAPH was used to generate peroxy radicals through its spontaneous decomposition at 37°C. As such, 75 µL of a 8.6 µg/mL AAPH solution was also injected in the wells after three cycles of excitation/emission. The complete analysis consisted of 35 recordings of the fluorescence for each cycle of excitation at 485 nm and emission at 520 nm, for a total 120 min analysis.

ORAC values were obtained by assessing the area under the curve (AUC) corresponding to each sample using **Eq III.2**:

$$AUC_{\text{sample}} = \left(1 + \frac{f_4}{f_3} + \frac{f_5}{f_3} + \frac{f_6}{f_3} + \dots + \frac{f_{35}}{f_3}\right) \times t_{\text{cycle}} \quad (\text{III. 2})$$

After deduction of AUC calculated for blank sample, AUC for extracts and standards were expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent per gram of dry extract ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) on the basis of Trolox standard curve ( $y = 0.477 x + 3.517$ ,  $r^2 = 0.998$ ).

#### ***EC<sub>50</sub> via DPPH• radical scavenging assay***

DPPH• assay was performed according to the same procedure and apparatuses already described. Extract and standard samples were prepared at several concentrations in order to calculate the half-maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>): for RMBE, final concentrations of 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 80  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5, 25, 50, 75, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  for SMBE, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g/mL}$  for Oligopin®, and 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$  for ascorbic acid. After mixing 100  $\mu\text{L}$  of each sample with 150  $\mu\text{L}$  of methanolic DPPH• (final concentration of 40  $\mu\text{g/mL}$ ) in microplate wells and incubating 30 min in darkness, absorbance values were read at 516 nm against a blank (100  $\mu\text{L}$  water instead of sample). For each sample, a linear regression on the data in triplicate (graphical plots of scavenging percentage versus concentration) provided an estimation of the EC<sub>50</sub> value. This result was normalised by DPPH• concentration, thus expressed as mg/g DPPH•, for comparison with literature data.

### **III.2.6. Statistical analyses**

Analysis of variance (ANOVA), principal component analysis (PCA) and correlation analysis were performed using SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Two-way ANOVA followed by *a priori* contrasts was used to study the influence of factors C and D (only D for SMBE) and examine statistical significance for the response variables (TEAC<sub>DPPH•</sub>, TPC, TSC, PC, ER, EC) monitored at the end of the different post-extraction processes. All results are presented as means  $\pm$  standard error (two replicates for RMBE, four replicates for SMBE). PCA allowed to synthesise in 2D the main similarities and differences of the processes based upon the six response variables studied whose contribution was reduced into only two axis *i.e.* principal components. The comparison of EC for the various unit operations and that of antioxidant potentials (ORAC, EC<sub>50</sub><sub>DPPH•</sub>) for the optimal extracts were performed using ANOVA followed by protected LSD test (least significant difference,  $\alpha = 0.05$ ). Graphical and schematic representations were produced using MATLAB software version 8.5.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA), GraphPad Prism 7.03 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and MS Office 2016, Visio (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

### III.3. Results and discussion

#### III.3.1. Process optimisation of the production of the maple bark extracts

With an aim to develop a simple but complete process (from raw material to final product) for the production of a dry extract while preserving its quality and composition, the selected unit operations were first applied to RMBE. The moderate energy consumption necessary to claim a “green” process was also considered when selecting the operations units. Those units were chosen among the most popular techniques to concentrate and dry food or natural products, feasible at a large scale. To this end, the operating parameters of the units were optimised and the optimum combinations of post-extraction processes were determined among the four possibilities depicted in *Figure III.1* (RO/SD, RO/FD, VE/SD or VE/FD). Thereafter, the optimised treatments were applied to produce SMBE providing clues about the robustness of the processes.

##### *Operating conditions optimised for the post-extraction processing of RMBE*

Among the two techniques implemented during the concentration step of the process, reverse osmosis was optimised by controlling the temperature of the feed liquid at 40°C. The transmembrane pressure was adjusted at 250 psi, providing an average flow rate of 190 mL/min inducing limited fouling due to the short operating time (16 min) and the relatively low concentration of the extracts. In comparison, vacuum evaporation, the other unit operation used for the concentration step required higher temperature (65°C) for the elimination of water and more power to maintain dynamic vacuum. The volume recovery of the extracts was fixed to 2 L due to inherent limitations of the reverse osmosis apparatus (dead volumes). For comparison, 2L of vacuum evaporated extracts was also recovered. Concentrated RMBE were obtained at  $10.4 \pm 1.6$  g/L ( $W_{\text{dry extract}}/V_{\text{water}}$ ) using either reverse osmosis or vacuum evaporation. Due to the moderate concentration of the extracts, a rotary disc atomiser (*Figure III.1*) was chosen to perform spray-drying instead of the standard atomiser nozzle (more suitable for highly concentrated liquids).

Adequate drying of the 2-L aqueous extract was achieved with the air input (5 bar) set at a temperature of 220°C while the flow rate of the extract feed was fixed at 2.4 L/h. These optimised settings led to a temperature of 90°C in the drying chamber for spray-drying runs of 50 min. It was deemed acceptable considering that the extraction step was also performed at 90°C and lasted about the same time (1 h). In comparison, satisfactory freeze-drying was achieved over a much longer duration (48 h) inducing a lower productivity but also great energetic costs. These costs are mainly due to the need to maintain the ice condenser at -50°C for an extended time. However, considering the large capacity of the freeze-dryer used, *EC* was calculated by normalising the total energy consumption to produce values for each samples (2 L) using the dehydration rate (0.5 L/h). Despite these adjustments for comparison purposes, freeze-drying remained by far the most power-consuming post-extraction process as highlighted in *Figure III.2*. Requiring 12.8 kWh/kg of dry bark extracted, it used more than four times the energy consumption of the spray-drying or the extraction steps (respectively, 2.9 and 3.0 kWh/kg). In terms of concentration, vacuum evaporation

with 2.0 kWh/kg needed more power than reverse osmosis with only 0.3 kWh/kg. Finally, the separation step (centrifugation and filtrations) also accounted for only 0.3 kWh/kg. These values (*EC* for FD included) remain moderate compared to those obtained for biomass extraction processes from previous works (7.1–41.7 kWh/kg) as discussed by Geoffroy *et al.* (2017a).

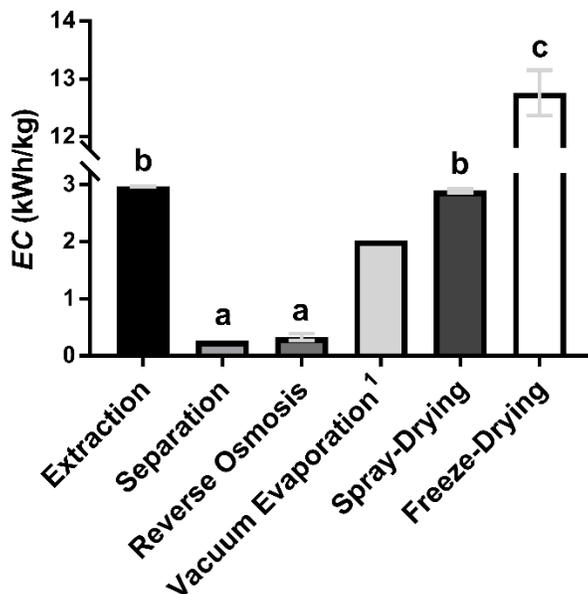


Figure III.2: Energy consumption calculated using the variable *EC*, associated to each unit operation of maple bark extract production processes. *EC* values are based on two repetitions and expressed in kWh/kg of extracted bark (on dry basis). <sup>1</sup>*EC* value for vacuum evaporation could not be measured in duplicate.

Regardless, depending on the process for the production of antioxidants (or other bioactive substances), electricity supply can easily represent the main environmental and economic impact (Pérez-López *et al.* 2014). Besides, considering the substantial disparities in terms of power consumption between the operation units, creating and selecting a variable *EC* as one of the key factor for optimising the production process of maple bark extract seemed highly relevant.

#### Optimisation of the processing of RMBE using PCA

The optimisation of a process based upon several response variables is usually achieved using multivariate analysis tools such as principal component analysis (PCA) or response surface methodology (RSM) (Brütsch *et al.* 2017 ; Dorta *et al.* 2013). In our case, PCA was applied to the RMBE data in order to synthesise the results obtained and help with the selection of the most suitable post-extraction processing. By doing so, the six variable studied ( $TEAC_{DPPH}^{\bullet}$ , TPC, TSC, PC, ER, *EC*) were combined into two principal components to allow a simple graphical representation (**Figure III.3a**). The importance of those two dimensions of variability is similar as Component 1 (horizontal axis) stands for 49.8% of the total variance while Component 2 (vertical axis) explains 42.7% of the total variance. Therefore, this model is adequate with 92.5% of information from the initial dataset being preserved. The analysis of **Figure III.3a** also reveals that three response variables: energy consumption (*EC*), extract recovery (ER) and protein content (PC) are

positively loaded on Component 1 (correlation with the axis at  $p < 0.0001$  for each variable). The remaining three variables: antioxidant capacity ( $TEAC_{DPPH^\bullet}$ ), total phenolic content (TPC) and total sugar content (TSC) are positively loaded on Component 2 (correlations with the axis respectively at  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.01$ ). Thus, Component 2 globally represents the quality of RMBE including its major compounds ( $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC) and it seems reasonable to aim for the highest values for all three variables. On the contrary, Component 1 combines conflicting variables: on one hand, the protein content and the yield in extract (PC, ER) that one would want to maximise and on the other hand the energetic cost of the process (EC) which has to be minimised. In this regard, choosing the variables to be favoured would be at the discretion of the user on a case-by-case basis.

Based upon the two components, the four post-extraction processes exhibit different profiles of variables ( $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC, TSC, PC, ER, EC) as depicted in **Figure III.3b**. The association vacuum evaporation/spray-drying (VE/SD) appears to demonstrate the lowest values of  $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC, as well as low EC, ER and PC values. On the opposite, reverse osmosis associated with freeze-drying (RO/FD) exhibits the highest  $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC values and high EC, ER and PC values. VE/FD is also defined by high EC, ER and PC values but low  $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC. Finally, RO/SD and VE/FD provide intermediary results. RO/SD is characterised by minimum EC, ER and PC and medium  $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC, while VE/FD shows a profile of low  $TEAC_{DPPH^\bullet}$ , TPC and TSC combined with the highest EC, ER and PC values.

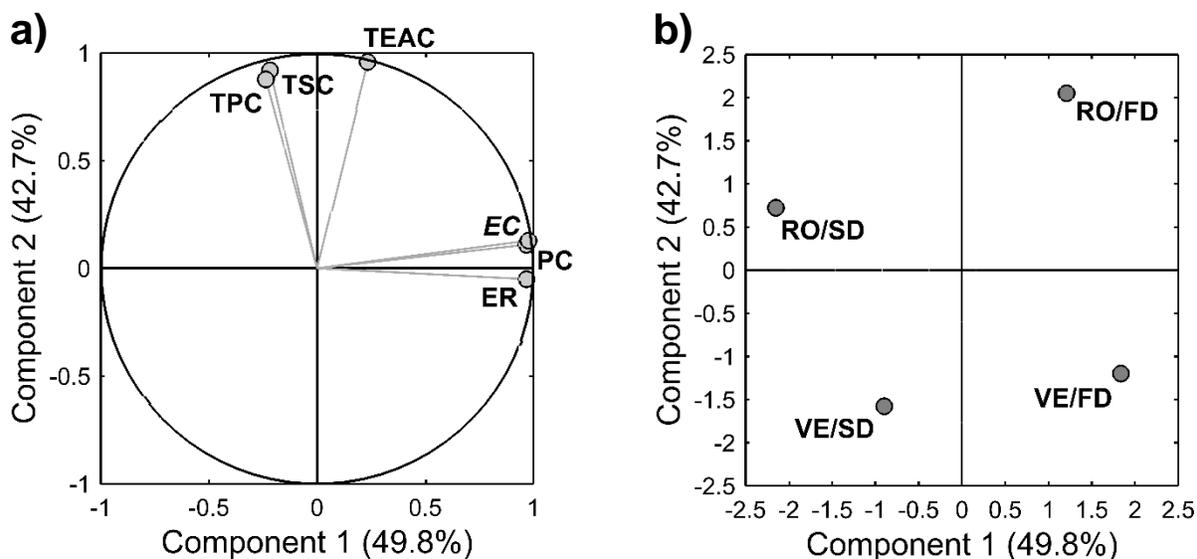


Figure III.3: Principal component analysis for red maple bark extract production processes: a) loading plot for the response variables studied; b) score plot for treatments i.e. the different post-extraction processes. TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TPC, total phenolic content; TSC, total sugar content; PC, protein content; ER, extract recovery; EC, energy consumption; VE, vacuum evaporation; RO, reverse osmosis; SD, spray-drying; FD, freeze-drying.

In order to discuss the results obtained through PCA, the raw data and the contrasts displayed in **Table III.1** were useful to apprehend the relative influence of each variables depending on the direction (horizontal: Component 1 or vertical: Component 2). As already mentioned, it was difficult to conclude about Component 1 considering the similar evolution of antagonist variables EC and ER. Larger differences were

observed between treatments for these two variables compared to the low PC values being close to each other (**Table III.1**). PC was thus deemed of lesser importance compared to *EC* and ER. Based upon Component 1 (**Figure III.3b**), post-extraction processes involving freeze-drying seem to favour the extract recovery over the energy savings, more typical of spray-drying processes. Moreover, using the results of the contrast “VE vs RO” for *EC* and ER (**Table III.1**), it is possible to conclude that no significant difference is detectable in terms of extract recovery between respectively, RO/SD and VE/SD, or RO/FD and VE/FD. Nevertheless, still along Component 1 (**Figure III.3b**) but in terms of energy consumption, those treatments are significantly different ( $p < 0.0001$ ). Therefore, the horizontal distribution of the treatments seems to be more influenced by *EC* than ER.

*Table III.1: Chemical composition, antioxidant capacity and recovery of red maple bark extract (RMBE), and energy consumption of the processes, depending on the different combinations of unit operations performed.*

	TEAC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (μmol TE/g)	TPC (mg GAE/g)	TSC (mg GFRAE/g)	PC (mg BSAE/g)	ER (%)	EC (kWh/kg)
VE/SD	4347 ± 103	445 ± 1.3	335 ± 6.7	19.6 ± 0.5	73.7 ± 14.2	8.1 ± 0.2
VE/FD	4461 ± 16.6	448 ± 0.2	329 ± 6.5	22.6 ± 0.2	99.9 ± 0.0	17.7 ± 0.2
RO/SD	4708 ± 55.4	456 ± 2.0	346 ± 5.5	17.9 ± 1.1	64.2 ± 3.6	6.4 ± 0.0
RO/FD	5275 ± 7.3	454 ± 0.8	354 ± 4.2	22.5 ± 0.5	92.6 ± 2.3	16.0 ± 0.0
<b>Contrasts</b>						
VE vs RO	***	***	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	****
SD vs FD	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	**	**	****
RO/SD vs RO/FD	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	**	*	****

*VE vacuum evaporation, RO reverse osmosis, SD spray-drying, FD freeze-drying, TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup> Trolox equivalent antioxidant capacity, TPC total phenolic content, TSC total sugar content, PC protein content, ER extract recovery, EC energy consumption, TE Trolox equivalent, GAE gallic acid equivalent, GFRAE galactose fructose rhamnase arabinose equivalent, BSAE bovine serum albumin equivalent. Results based on two replicate and expressed as mean ± standard deviation. According to a priori contrasts, ns not significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .*

In this case, despite the lower ER values observed using spray-drying, the processes involving this technique still appear to be suitable in regards to the least influence of ER and the low *EC* values produced. The choice of spray-drying could then be dictated by its high productivity (despite losses) and the possible energy restrictions, in particular if a “green extraction” (Chemat *et al.* 2012) is required to meet sustainable criterions. Now considering the distribution of the variables TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup>, TPC and TSC along Component 2 (**Figure III.3a**), the most interesting processes in regards of the quality preservation of RMBE would be those in the upper part of **Figure III.3b**. Incidentally, the processes involving reverse osmosis seem to maximize the quality of RMBE. The high level of significance of the contrast “VE vs RO” for the three variables TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup>, TPC and TSC together with the absence of significance for “SD vs FD” for TPC and

TSC (*Table III.1*) confirm the division of Component 2 into two opposite clusters: RO/SD and RO/FD vs VE/SD and VE/FD (*Figure III.3b*).

Overall, treatments using reverse osmosis have greater potential toward all variables. Conclusions between RO/SD and RO/FD are less obvious. RO/FD maximises TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup> and ER while RO/SD minimises EC with favourable results in terms of TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup> and chemical composition.

### *Validation of the optimised processes with SMBE*

After establishing the superiority of reverse osmosis over vacuum evaporation and considering the difficulty to conclude on the best drying technique, it was interesting to confirm the results obtained for red maple by applying RO/SD and RO/FD to sugar maple bark extract. Performed in the same conditions as for RMBE but based on four replicates, those different ways of processing SMBE produce similar ER and EC values (*Table III.2*) confirming the satisfactory repeatability of both processes based upon these two variables. As previously observed for RMBE, using spray-drying rather than freeze-drying is more interesting to reduce power consumption. Still, spray-drying produces dramatically lower extract yields. Although not investigated in this study, the recovery of spray-dried extracts could be highly improved by the use of a carrier to minimise clogging mostly due to the presence of simple sugars in the extract (Moffhammer *et al.* 2006). In the food industry, maltodextrin is commonly used as the carrier but other encapsulation wall materials such as gum arabic or guar gum can exhibit more suitable properties depending on the application (Kuck et Noreña 2016). The addition of a fluid bed to the spray-drying apparatus would also improve the extract recovery (Schuck *et al.* 2015). In such a situation, considering an improved extract recovery, the inherent productivity of spray-drying and the current five variables remaining, it would seem justified to select RO/SD as the optimal post-extraction treatment.

*Table III.2: Chemical composition, antioxidant capacity and recovery of sugar maple bark extract (SMBE), and energy consumption of the processes, depending on the different combinations of unit operations performed.*

	TEAC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (μmol TE/g)	TPC (mg GAE/g)	TSC (mg GFRAE/g)	PC (mg BSAE/g)	ER (%)	EC (kWh/kg)
RO/SD	525 ± 10.8	187 ± 4.8	567 ± 18.2	8.8 ± 0.6	59.0 ± 5.9	6.5 ± 0.0
RO/FD	561 ± 4.0	189 ± 4.6	565 ± 16.6	9.3 ± 0.6	91.9 ± 3.2	16.6 ± 0.0
<b>Contrasts</b>						
RO/SD vs RO/FD	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	****	***	****

Focusing on the variables standing for the quality of the extract (TEAC<sub>DPPH</sub><sup>•</sup>, TPC, TSC and PC), SMBE values produced either through RO/SD and RO/FD (*Table III.2*) are different from the analogue values obtained for RMBE (*Table III.1*), inducing two different chemical profiles. However, the ranking of the processes for each variable as well as the significance of the contrast (RO/SD vs RO/FD) are the same

for both types of extract (non-significant in terms of phenolic and sugar contents, significant for the other variables). These results tend to demonstrate the acceptable repeatability of the optimised processes for both maple extracts despite their singular characteristics.

### III.3.2. Application potential of the maple extracts

In order to highlight the interest of safely producing high-quality dry maple bark extracts at lower cost, it seemed relevant to direct our future research towards viable applications. To this end, it was necessary to scrutinise the distinct chemical profiles of both maple bark extract as well as their specific antioxidant activities.

#### *Chemical composition of RMBE and SMBE*

For rapid determination providing decent quantitative significance, the exploration of the major water-soluble constituents of both aqueous extracts was performed using colorimetric methods. Although meaningful for the optimisation of the process due to the relatively low variability of such assays, the chemical compositions presented in this study remain mere estimations (*Table III.1, Table III.2*).

To determine the content in phenolic compounds, a modified Folin–Ciocalteu method was used (Scalbert *et al.* 1989) as previously described. This criticised method, due to possible interferences with some sugars and aromatic proteins, remains acceptable for total phenolics estimation especially when using gallic acid as the reference standard (Prior *et al.* 2005). In our case, the optimised RMBE appears to contain 2.4 times more phenolics than SMBE (*Table III.1, Table III.2*). In terms of gallic acid equivalent (GAE), the phenolic compounds of RMBE represent about 45.5% ( $W_{GAE}/W_{dry\ extract}$ ) of the extract against about 18.8% for SMBE. An opposite trend is observable for the sugar content of both maple extracts. SMBE (56.6% of sugars in terms of GFRAE, galactose fructose rhamnose arabinose equivalent) exhibits a sugar content 1.6 times higher than that of the optimised RMBE, about 35.0% ( $W_{GFRAE}/W_{dry\ extract}$ ). When applying the phenol-sulfuric acid method to assess spectrophotometrically the sugar content, a shift of the absorbance peak may occur depending on the structure of the simple carbohydrates monitored (Cui et Brummer 2005). To reduce potential bias and improve the quantification, an equimolar mixture of different carbohydrates (hexoses or pentoses with structures and masses susceptible to match compounds from maple bark extract) was used as the standard and the absorbance was measured at the standard wavelength 490 nm (Masuko *et al.* 2005). Compared to phenolic compounds and carbohydrates, small amounts of proteins are found in both RMBE and SMBE (*Table III.1, Table III.2*). Optimised RMBE contains only about 2.0% proteins based on bovine serum albumin equivalent (BSAE) while it amounts to 0.9% ( $W_{BSAE}/W_{dry\ extract}$ ) in SMBE. The Bradford assay performed here quantifies proteins with a molecular weight superior to 3 000 Da, meaning that simple amino acid structures and their oligomers are possibly overlooked. Nevertheless, considering the critically small amounts, a valorisation of the maple bark extracts based on peptides or proteins alone does not seem viable.

In regard of its very high sugar content, SMBE could be suitable for a valorisation focusing on carbohydrates. A recent study from our laboratory established that similarly to maple syrup, SMBE contains

a relatively high sucrose content (Bhatta 2018). However, contrary to the syrup demonstrating very few complex sugars with only 2% of total sugars being polysaccharides and almost 0% of oligosaccharides (St-Pierre, P. *et al.* 2014), those complex sugars stands for almost 54% in SMBE (Bhatta 2018). Interestingly, oligo/polysaccharides considered of pectic and hemicellulosic structures have already been extracted from bark (Norway spruce) and exhibited immunostimulating activities (Le Normand *et al.* 2014). Here, the significantly high content is most likely due to hemicellulosic oligosaccharides as bark and lignocellulosic biomass in general contains up to 40% of hemicellulose. These water-soluble highly branched polymers of pentoses and hexoses, similarly to oligosaccharides from other sources are increasingly investigated in the food industry as, *inter alia*, potential prebiotics (Otieno et Ahring 2012). Incidentally, inulin, a prebiotic oligosaccharide has been isolated from sugar maple syrup (Sun *et al.* 2016). Considering all this, additional investigations of the structures and possible immunostimulating activities of the oligo/polysaccharides present in SMBE seem relevant to provide information about their potential for prebiotic applications. Being of less interest for a specific application, the low content in phenolic compounds in SMBE associated to a large variety of structures found in sugar maple bark (Yuan *et al.* 2011) could still present interest as a food additive if used as a *totum*.

In comparison to that diversity, RMBE possesses essentially one major class of phenolic compounds, galloyl-glucitol derivatives at high concentrations. Only 12 of these particular hydrolysable gallotannins were detected at 280 nm among which ginnalin A, the major phenolic compound of the extract (Geoffroy *et al.* 2017c). This compound accounting for 12.2% (w/w) of RMBE, as well as most of the other 11 galloyl-glucitol derivatives were already investigated for their anticancer and antidiabetic potential showing significant  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, antiglycating and antioxidant activities (Ma *et al.* 2016). In addition, hydrolysable gallotannins (*e.g.* tannic acid) are considered as Generally Recognised As Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA) up to 400 ppm as ingredients in food products (Maqsood *et al.* 2012). Knowing this, the potential of RMBE for food applications could be improved after concentration of the galloyl-glucitol tannins. Even if confirmed human toxicity induced by *Acer* extracts is hardly reported (compared to the total number of toxicity studies about *Acer*), some of these plants exhibit veterinary safety concern (Bi *et al.* 2016). As such, for direct use as a *totum* to produce a functional food, RMBE as well as SMBE would need more *in vivo* investigations. For now, preliminary results from another work by our team provided clues on the non-toxicity of both extracts by studying their effect on human neutrophil viability (Bhatta 2018) confirming previous observations for hot-water extracts from maple buds (Meda *et al.* 2017b).

Besides the chemical composition, supplementary information was required to consider an application of red and sugar maple bark extracts as a bioactive food additive. Focussing on the antioxidant potential of those extracts, standard assays were performed to produce reference values for both RMBE and SMBE.

### *Antioxidant potential of the extract*

TEAC<sub>DPPH•</sub> values displayed in **Table III.1** and **Table III.2** demonstrated substantial differences in terms of antioxidant activities between the studied extracts. In accordance with the higher phenolic content of optimised RMBE, the antioxidant capacity for red maple optimised processes (4708 and 5275 μmol TE/g) is also higher than that of the optimised SMBE (525 and 561 μmol TE/g). To confirm these results and put them into context, ORAC values as well as EC<sub>50</sub> towards DPPH• values were determined for RMBE, SMBE and two standards (**Table III.3**). Ascorbic acid (vitamin C) was chosen as standard due to its large use particularly in foods as natural antioxidant (Pinchuk *et al.* 2012). Oligopin®, a specific fraction from maritime pine (*Pinus pinaster*) bark extract also seemed relevant for comparison with our optimised extracts. Commercially available and already employed as an additive in some food products, this bark extract has demonstrated potent effects in reducing particular cardiovascular disease risk factors (Valls *et al.* 2016). The two measurements ORAC and EC<sub>50</sub> using DPPH• were chosen for their large use providing a substantial amount of references but also due to the different mechanisms involved. The ORAC test is based on H-atom transfer (HAT) (Prior *et al.* 2005), while the DPPH• assay is supposedly based on the fast sequential proton-loss electron transfer mechanism (SPLET) when performed in a protic solvent such as methanol (Foti 2007). Moreover, the methods for measurement involved are also different, DPPH• scavenging is based directly on the rate of oxidation of the studied antioxidants whereas ORAC values are obtained by measuring the protection of an indicator (phycoerytherin or fluorescein) induced by the antioxidant against oxidation (Pinchuk *et al.* 2012).

*Table III.3: Antioxidant potential (ORAC value and EC<sub>50</sub> towards DPPH• value) of optimised sugar and red maple bark extracts compared to standard food additives.*

	RMBE	SMBE	Oligopin®	ascorbic acid
ORAC (μmol TE/g)	5096 ± 584 <b>b</b>	3152 ± 145 <b>c</b>	17050 ± 491 <b>a</b>	2790 ± 67.1 <b>c</b>
EC <sub>50</sub> DPPH• (mg/g DPPH•)	125.6 ± 5.26 <b>a</b>	962.8 ± 12.7 <b>c</b>	232.2 ± 11.2 <b>b</b>	111.1 ± 1.58 <b>a</b>

*EC<sub>50</sub> DPPH• values correspond to the effective concentrations of extract or standard required to scavenge 50% of initial DPPH• (normalized by DPPH• initial concentration). Results based on three replicate and expressed as mean ± standard deviation. Different lowercase letters (within the same row) induce significant difference at p < 0.05 (protected LSD).*

Both optimised maple bark extracts produced moderate ORAC values compared to Oligopin® but satisfactory with respect to ascorbic acid (**Table III.3**). The value for Oligopin® accounts for 3.3 times the ORAC value of RMBE and 5.4 times that of SMBE. Yet, the values for both extracts are of the same order of magnitude as the value for ascorbic acid. The ORAC value of SMBE is non-significantly different from that of ascorbic acid while the value for RMBE is almost two times higher. The EC<sub>50</sub> DPPH• results show a much higher activity (low EC<sub>50</sub>) for RMBE and ascorbic acid (non-significantly different) compared to the ORAC test results. Oligopin® is approximately two times less potent than RMBE in terms of DPPH• radical scavenging while SMBE is up to 7.7 times less potent.

The antioxidant potential of the two optimised maple bark extracts was also highlighted by comparisons with other natural products and food additives. As an example, maple syrup extract produced by removing most carbohydrates achieved an  $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$  value of 1807 mg/g DPPH $^\bullet$  far below the results for RMBE (**Table III.3**) and about twice less potent in terms of DPPH $^\bullet$  scavenging than SMBE (Zhang, Y. *et al.* 2014). Moreover, comparing our maple bark extracts to the aqueous ethanol extract from propolis a bee product used in the food industry ( $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$  as low as 640.0 mg/g DPPH $^\bullet$  and ORAC up to 2012  $\mu\text{mol TE/g}$ ), antioxidant values appear of similar order of magnitude (Miguel *et al.* 2014). A comparable conclusion holds for cranberry pomace extract and cranberry fruit extracts respectively at 343.2 mg/g DPPH $^\bullet$  ( $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$ ) and 3690–10050  $\mu\text{mol TE/g}$  (ORAC) (Abeywickrama *et al.* 2016 ; Rupasinghe *et al.* 2016). Finally, red wine extract exhibits an  $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$  value (1380 mg/g DPPH $^\bullet$ ) close to the value for SMBE and an ORAC value (6942  $\mu\text{mol TE/g}$ ) closer to that of the optimised RMBE (Bouarab-Chibane *et al.* 2017 ; Ou, B. *et al.* 2001).

### III.4. Conclusions

We report for the first time a process optimisation at pilot scale for the production of maple bark extracts for food applications. As comparative studies on the optimal ways of processing bioactive extracts remain scarce, this work provides useful data on the complete process to obtain a dried product taking into consideration qualitative, quantitative and power consumption aspects. Optimal processes consisted of the extraction (90°C, 1h, 1/10) of milled and sieved bark, its separation from the aqueous extract by coarse filtration, centrifugation and plate filtration, concentration of the extract by reverse osmosis (more efficient than vacuum evaporation) and drying. Two drying options were kept for the optimal process, either freeze-drying to maximise the recovery and the quality of the extract or spray-drying to maximise the “green” aspect and the productivity of the process by maintaining a satisfactory quality of the extract. The moderate energy consumption induced by both optimised processes added to the high interest of producing maple bark extracts. The chemical and antioxidant screenings of the extracts from both maple species studied demonstrated that RMBE could preferably be selected for applications based on its antioxidant phenolic compounds (TPC, 455 mg GAE/g;  $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$ , 5.02  $\mu\text{g/mL}$ ) while SMBE, despite decent ORAC and  $EC_{50\text{ DPPH}^\bullet}$  values showed more promise as a source of carbohydrates (TSC, 566 mg GFRAE/g). The next steps before a possible production at larger scale of these high-added value extracts would include confirming *in vivo* non-toxicity. If so, life cycle investigations could be relevant to provide supplementary details on the sustainability of a large-scale production process.

#### *Acknowledgements*

The authors are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Levaco Inc. (Grant no. RDCPJ-452658-13) and Decacer Inc. for financial support, to Mr. Clermont Levasseur for assistance with plant authentication, and to Mrs. Diane Gagnon, Mrs. Mélanie Martineau and Mr. Pascal Lavoie for technical assistance.

### III.5. Analyses complémentaires

Pour mieux appréhender les différences observées en termes de teneur en phénols totaux, les profils phénoliques de l'écorce d'érable rouge, *Acer rubrum* (AR) et d'érable à sucre, *Acer saccharum* (AS) ont été comparés. Les différents extraits d'AR produits par concentration et séchage ont également été comparés. Dans un souci de cohérence linguistique, RO correspondant à l'osmose inverse sera noté O dans cette partie et les prochains chapitres. Au même titre, VE l'évaporation sous vide devient E, SD (atomisation) devient A et FD (lyophilisation) devient L. Ceci donne les traitements post-extraction suivants : AR ou AS EA, EL, OA, OL.

#### III.5.1. Méthodes de chromatographie liquide

Dans le cas des deux essences (AR, AS), l'appareillage d'HPLC analytique consistait en un système de chromatographie liquide Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), équipé d'une pompe binaire, d'un *autosampler*, d'un compartiment à colonne thermostaté (30°C), d'un DAD et du logiciel d'acquisition de données Agilent ChemStation (Agilent Technologies). La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm). Les composés phénoliques d'AR et AS ont été observés à 280 nm et 350 nm. Les mêmes phases mobiles ont été utilisées A (eau/acide formique) et B (acétonitrile/méthanol/eau) à 0,7 mL/min, selon deux gradients d'élutions différents adaptés de Meda *et al.* (2017b) :

- AS : 0–6% B pour 0–10 min, 6% B pour 10–25 min, 6–10% B pour 25–35 min, 10–12% pour 35–55 min, 12–20% B pour 55–95 min, 20–25% B pour 95–105 min, 25–27% B pour 105–108 min, 27% B pour 108–120 min, 27–40% B pour 120–140 min.
- AR : 0% B pour 0–3 min, 0–6% B pour 3–25 min, 6–15% B pour 25–35 min, 15% pour 35–48 min et 15–60% B pour 48–55 min.

Les échantillons ont été préparés respectivement à 5 mg/mL (AS) et 2,5 mg/mL (AR) dans l'eau avant injection de 10 µL en HPLC. Les extraits d'érable rouge produits selon les divers procédés (AR EA, AR EL, AR OA, AR OL) ont été enregistrés à 280 nm dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour AR. En se basant sur l'aire sous la courbe (AUC) des 12 pics majoritaires des chromatogrammes obtenus, les quatre extraits ont été soumis à une analyse en composantes principales (ACP) pour mettre en évidence leurs différences et similitudes.

#### III.5.2. Profils chromatographiques des deux essences

D'un point de vue purement qualitatif, il est intéressant de noter que les profils phénoliques des extraits à l'eau chaude de l'écorce des deux érables diffèrent grandement (*Figure III.4*). En effet, des programmes d'élution différents ont été nécessaires pour séparer les composés phénoliques. Celui de l'érable à sucre étant presque trois fois plus long que son homologue pour l'érable rouge traduit la grande diversité de structures présentes chez *Acer saccharum*. Des dérivés d'acides-phénols sont observables à 280 nm, tandis

que les structures visibles à 350 nm semblent être des dérivés coumarines déjà mis en évidence (Yuan *et al.* 2011), et possiblement des flavonoïdes. Le profil phénolique de l'érable rouge est beaucoup plus simple. À 280 nm, on peut repérer une dizaine de pics seulement tandis que les pics à 350 nm sont quasi-inexistants.

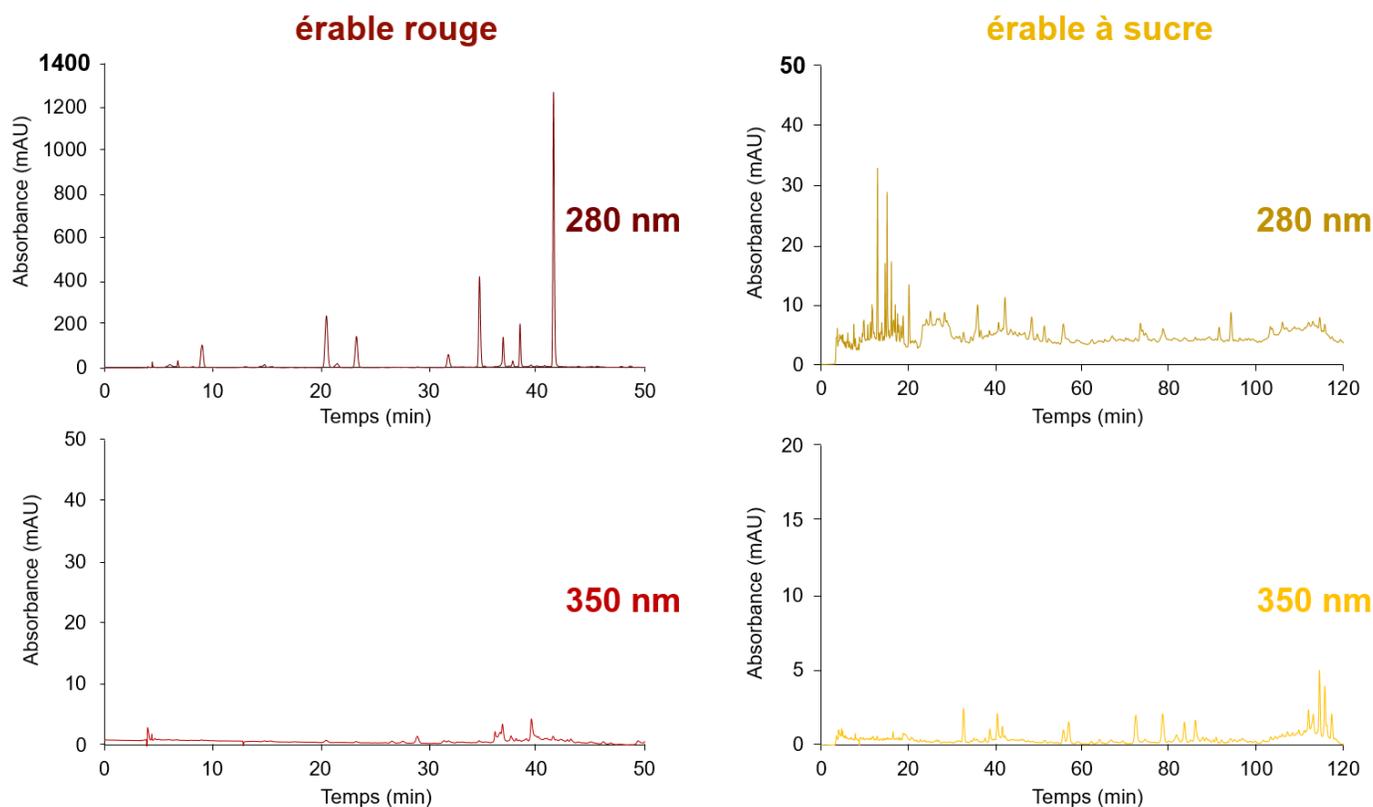


Figure III.4 : Chromatogrammes des extraits de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre à 280 nm et 350 nm.

Outre ces différences qualitatives, les extraits d'écorce des deux érables démontrent de grandes différences quantitatives, comme discuté en III.3.2., après évaluation de leurs teneurs respectives en phénols totaux. Ceci est directement illustré en **Figure III.4** par les écarts importants en termes d'échelles pour les chromatogrammes représentés (1400 mAU vs 50 mAU).

La quantité supérieure en composés phénoliques observables à 280 nm pour un nombre raisonnable de structures nous a conduit à nous concentrer sur le profil phénolique de AR à 280 nm pour évaluer l'effet des traitements post-extractions.

### III.5.3. Effet des procédés sur le profil de l'érable rouge

Les profils HPLC à 280 nm des différents extraits AR EA, AR EL, AR OA, AR OL sont représentés en **Figure III.5**. Une des premières constatations est la faible différence qualitative entre les profils. Après toutes les combinaisons de traitements post-extraction, les 12 pics repérés demeurent visibles. À l'exception de très légères variations de temps de rétention des composés 7 à 12, les différences entre chromatogrammes semblent inexistantes. Afin de s'en assurer les aires sous la courbe ou AUC des 12 pics ont été relevées pour comparaison.

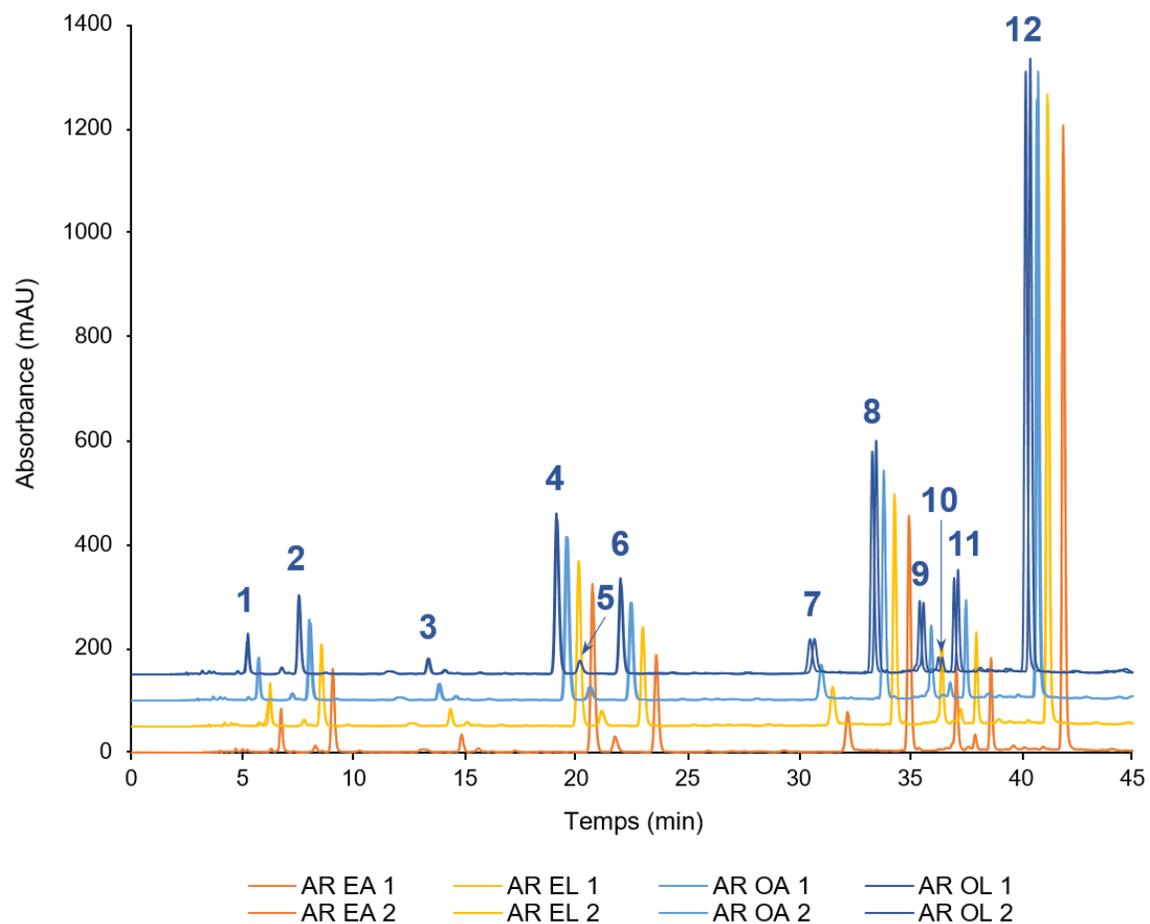


Figure III.5 : Chromatogrammes des extraits d'écorce d'érable rouge issus des différents traitements post-extractions réalisés en laboratoire pilote. Deux répétitions représentées, 12 composés majoritaires observés à 280 nm (1–12).

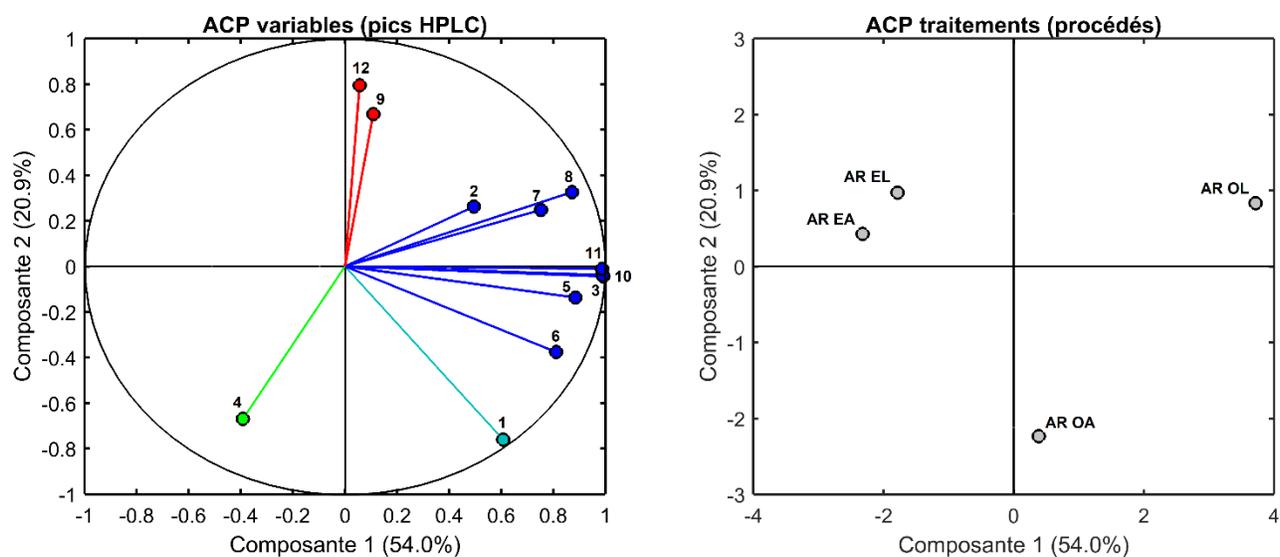


Figure III.6 : Analyse en composantes principales des profils HPLC à 280 nm des extraits d'écorce d'érable rouge produits au laboratoire pilote (AR EA, EL, OA, OL).

Les différences observées en termes d'AUC entre les différents profils, bien que faibles ont orienté le choix d'un profil optimal. Une analyse en composantes principales ou ACP similaire à celle présentée en III.3.1. a été réalisée en gardant les procédés post-extraction en tant que traitements mais en utilisant cette fois les 12 pics d'HPLC en tant que variables (*Figure III.6*).

La composante principale 1 traduit 54% de la variance totale tandis que la composante 2 ne compte que pour moins de 21% (*Figure III.6*). En s'intéressant au graphe présentant les variables (gauche), on constate que les pics sont en majorité positivement corrélés avec l'axe horizontal (Composante 1). Les pics 4, 9, 12 ne sont pas interprétables selon cet axe, étant plutôt corrélés avec l'axe vertical (Composante 2), négativement pour 4 et positivement pour 9 et 12. En se reportant en *Figure III.6* au graphique présentant les traitements (droite), on déduit que le traitement AR OL, positivement corrélé avec l'axe horizontal, maximise l'AUC des pics 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, tandis que AR EA et EL (négativement corrélés) les minimisent. En appliquant le même raisonnement à l'axe vertical, AR OA maximise 1 et 4 tandis que les autres traitements maximisent 9 et 12.

En conclusion, il est donc possible de statuer de l'intérêt du traitement osmose inverse/lyophilisation pour maximiser la récupération de la grande majorité des composés phénoliques observables à 280 nm. Outre le pic 4, les 11 autres composés voient leur quantité sous forme d'AUC maximisée. Ceci a conduit à utiliser AR OL comme extrait référence pour l'identification par déréplication des 12 composés. Présentés dans le chapitre suivant, ces résultats sont complétés par une étude approfondie des possibles effets de matrice, induit par les autres constituants de l'extrait, sur l'activité antioxydante des 12 composés phénoliques majoritaires.

## IV. Chapitre 4 – Étude des composés phénoliques antioxydants majoritaires de l'extrait à l'eau chaude d'écorce d'érable rouge par méthodes de DPPH en pré-colonne.

Le chapitre 4 est constitué d'un article publié dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry* sous le titre : *Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloyl derivatives from red maple bark extract.*

Outre l'identification des composés phénoliques majoritaires de l'extrait à l'eau chaude d'écorce d'érable rouge, cet article discute la pertinence du criblage antioxydant par DPPH *spiking*. L'application de deux méthodes de DPPH en pré-colonne à travers l'exemple des dérivés galloyl-glucitols est également l'occasion d'approfondir la caractérisation du potentiel antioxydant de tels composés au sein de l'extrait.

### *Résumé*

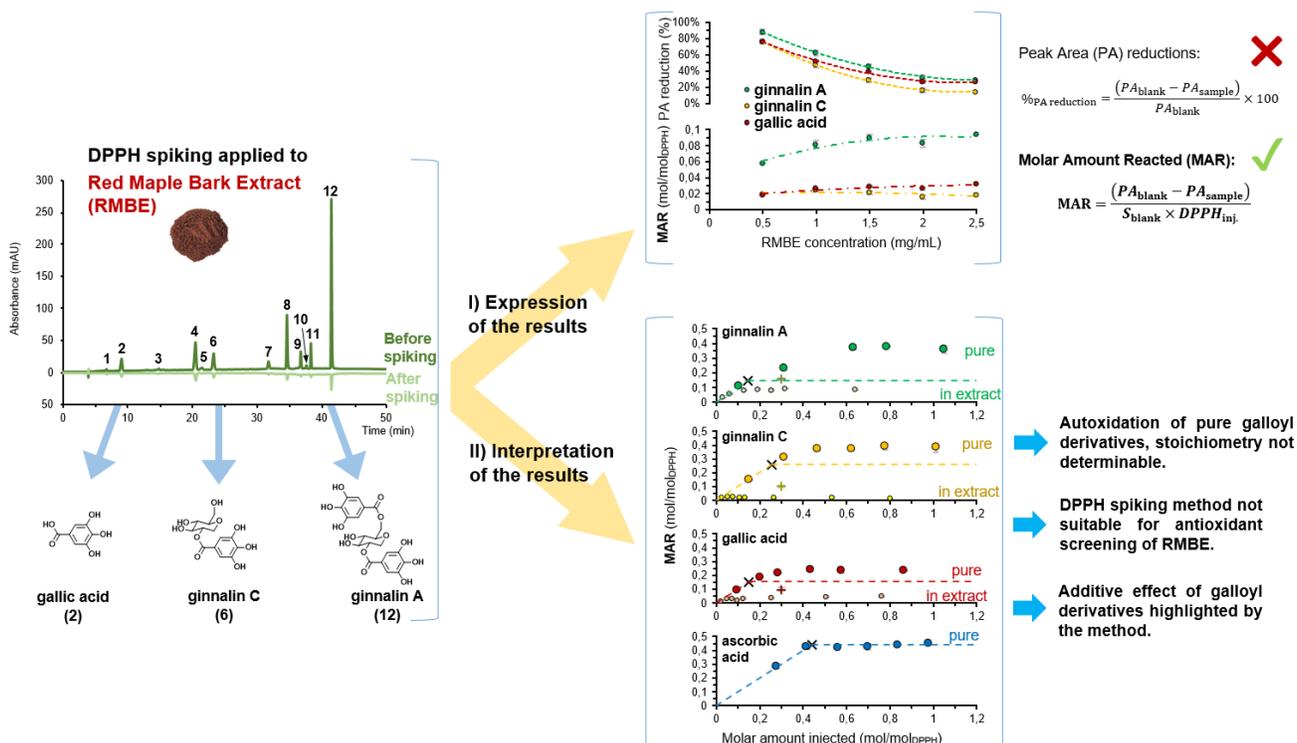
Les tests chimiques de piégeage de radicaux (ABTS, DPPH, ORAC...) sont généralement la première approche choisie pour mettre en évidence le potentiel antioxydant dans les produits naturels. Outre les tests colorimétriques standards, des méthodes couplées à des techniques de séparation ont gagné en popularité ces dernières décennies (méthodes *on-line* et pré-colonne). Évaluant par HPLC la réduction d'aire des pics, le *spiking* en pré-colonne permet une caractérisation rapide de matrices naturelles sans purification des composés. Toutefois, peu d'études s'intéressent à la pertinence des résultats obtenus. Cet article discute pour la première fois le potentiel du *spiking* en pré-colonne utilisant le test au radical DPPH<sup>•</sup> (DPPH *spiking*) pour identifier des composés antioxydants en se basant sur l'extrait d'écorce d'érable rouge. Dans un premier temps, la technique de *spiking* a été appliquée de manière conventionnelle aux composés galloyl-glucitol dans l'extrait. Ceci a exposé les inexactitudes induites par une mesure basée sur la réduction d'aire des pics. Par la suite, la méthode a été appliquée aux composés purs en évaluant, pour plus de rigueur, leur quantité de matière ayant réagi (molaire). La comparaison de la méthode avec la technique de DPPH–HPLC/AE qui, elle, dose directement le radical DPPH<sup>•</sup> a souligné l'inaptitude du DPPH *spiking* à mesurer l'efficacité antioxydante (stœchiométrie) des composés. Malgré ces limitations, le *spiking* a permis la mise en évidence d'un phénomène d'auto-oxydation et d'effets de matrice/mixture étudiés grâce à des mélanges tertiaires de composés galloyl-glucitol. Bien que restreinte à des composés issus d'une seule matrice, l'étude remet en cause la technique de *spiking* telle qu'usuellement employée. Ce travail pourrait donc initier de plus amples investigations *e.g.* sur l'exploration d'autres produits naturels et/ou sur des considérations cinétiques de la méthode.

### *Abstract*

To investigate the antioxidant potential in natural products, radical scavenging tests (ABTS, DPPH, ORAC...) are usually considered as the first approach. In addition to the standard colorimetric assays,

methods using separation techniques (on-line and pre-column assays) have been developed in the past decades. Based on the peak area (PA) reductions of compounds monitored by HPLC, the pre-column spiking method allows rapid characterisation of natural matrices avoiding laborious isolation steps. Yet, available information about the significance of the results produced remains scarce. Here, we report for the first time, a discussion on the potential of the pre-column DPPH spiking method to pinpoint antioxidant compounds using red maple bark extract (RMBE). First, DPPH spiking was conventionally applied to the galloyl compounds in the extract showing the inadequacy of assessing results by PA reductions. The method was then applied to pure galloyl derivatives, evaluating their molar amount reacted (MAR) for more significance. The comparison with the standard DPPH–HPLC/AE method directly monitoring DPPH• inhibition highlighted the inability to retrieve the respective antioxidant efficiencies (AE) of each compound by using DPPH spiking. Despite its limitations, the DPPH spiking method brought to light an autoxidation phenomenon and a matrix/mixture effect investigated through tertiary mixtures of galloyl compounds. Although restricted to the compounds from one natural matrix, this study questions the validity of the spiking method as usually performed and could serve as a basis for further investigations (explorations of other natural products, kinetics considerations).

### Graphical abstract



### Keywords

pre-column HPLC, DPPH spiking, stoichiometry, autoxidation, mixture effect, red maple

## IV.1. Introduction

In natural products, plant primary and secondary metabolites are broadly referred to as phytochemicals. Generally exhibiting bioactivity, these substances are considered of great interest for human health (Liu 2003). Even though their long-term health benefits are still under investigation, phytochemicals and phenolic compounds in particular, are well-known for limiting oxidation processes (Foti 2007 ; Quideau *et al.* 2011). Naturally occurring in living organisms, oxidation is mainly caused by reactive oxygen species (ROS) (Mishra *et al.* 2012). An excess of those induces oxidative stress, causing free radical mechanisms such as lipid peroxidation and proteins or DNA oxidation to damage cells (Liu 2003 ; Ziyatdinova *et al.* 2005).

As such, the evaluation of the antioxidant properties of phytochemicals has become a major challenge in various research and industrial fields (medicine, pharmaceuticals, food, cosmetics...) (Mishra *et al.* 2012 ; Quideau *et al.* 2011). In chemical systems, radical scavenging studies are usually selected as the first approach. The principle is to quench typical radicals and convert them into more stable molecules (Schaich *et al.* 2015). Radical scavenging is mostly based on two main mechanisms. Either a hydrogen atom is directly transferred from the antioxidant compound (AH) to the radical species (R<sup>•</sup>) by H-atom transfer or HAT mechanism (*Eq IV.1*) (Foti 2007 ; Foti *et al.* 2004 ; Ingold et Pratt 2014 ; Quideau *et al.* 2011 ; Schaich *et al.* 2015). Or, one or more electrons are transferred to the radical through single-electron transfer or SET mechanism (*Eq IV.2*) (Quideau *et al.* 2011 ; Schaich *et al.* 2015). Besides, phenolic antioxidants in protic solvents (water, methanol, ethanol...) tend to be partially ionised into phenoxide anions (ArO<sup>-</sup>). The resulting fast electron-transfer mechanism (*Eq IV.3*) has been labelled as sequential proton-loss electron transfer or SPLET (Craft *et al.* 2012 ; Foti 2007 ; Foti *et al.* 2004 ; Friaa et Brault 2006 ; Ingold et Pratt 2014).



Based on these mechanisms, several *in vitro* tests have been developed in order to evaluate antioxidant properties by measuring radical scavenging. These techniques are mostly applied using colorimetric (ABTS, DPPH, FRAP, FeCA), chemiluminometric or fluorimetric (ONOO<sup>-</sup>, ORAC) assays (Chandrasekar *et al.* 2006 ; Craft *et al.* 2012 ; Friaa et Brault 2006 ; Olennikov *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2016 ; Schaich *et al.* 2015). Although largely used, limitations of these assays are often cited, *inter alia*, questionable biological significance or kinetics considerations (Craft *et al.* 2012 ; Foti 2015 ; Mishra *et al.* 2012 ; Schaich *et al.* 2015). Regardless of these hurdles, methods have been developed in the past decades using separation techniques, mainly High Performance Liquid Chromatography (HPLC). One of the most common examples is the pre-column DPPH–HPLC assay (Chandrasekar *et al.* 2006 ; Tang *et al.* 2008 ; Yamaguchi *et al.* 1998). Performed similarly as the popular DPPH radical scavenging test, the DPPH–HPLC method measuring directly the peak area of the DPPH<sup>•</sup> radical provides a better quantification than the original measurement by spectrophotometry. In fact, this method is particularly interesting for natural products susceptible to contain

coloured compounds or pigments as DPPH<sup>•</sup> can be carefully eluted to avoid any interference (Chandrasekar *et al.* 2006).

Apart from this particular method, other assays associating separation by HPLC to radical scavenging tests are primarily used for the rapid screening of antioxidant compounds in natural matrices (Zhang, Y.-P. *et al.* 2012), as they are claimed to avoid the long and laborious purification steps towards the isolation of pure compounds (Tang *et al.* 2008). Those screening methods comprise two main classes: the on-line post-column methods when the radical scavenging reaction takes place after the HPLC separation, and the pre-column methods for which this reaction is carried out before the separation.

On-line methods require a secondary pump system to inject radical-providing reagents after elution of the sample in the column. The merging of the radical stream and the post-column allows for the indirect monitoring of the antioxidant compounds indirectly. The absorbance (or chemiluminescence) decreases associated the scavenging of the radical species occurs at the corresponding elution times of the monitored compounds (Meda *et al.* 2017a ; Qi *et al.* 2016 ; Yang *et al.* 2016 ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). As natural constituents are separated before mixing with radical species, neither matrix nor synergistic effect can occur, thus limiting bias in the analysis. Yet, the absence of incubation time and the varied concentrations of the matrix constituents may skew kinetics and quantitative considerations, when using such on-line methods.

In these aspects, pre-column methods are closer to the standard colorimetric assays by spectrophotometry since mixing procedures and incubation times are similar prior to injection in the analytical apparatus. Performing the radical scavenging reaction before the separation also allows the use of less sophisticated pre-column instrumental set-ups compared to those of on-line systems (Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). Natural product constituents are directly monitored (at their specific wavelength when using diode array detection) and comparisons are made between peak areas (PA) of blank and reacted samples by evaluating PA reductions (Meda *et al.* 2017a ; Olenikov *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2016 ; Tang *et al.* 2008 ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). This technique called pre-column spiking generally allows for a more precise detection compared to the analogous on-line methods (Meda *et al.* 2017a ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). However, despite the increasing and legitimate interest for these pre-column methods, very few available studies are discussing the significance of the results produced using PA reductions (Tang *et al.* 2008). More specifically, it has never been questioned if monitoring the PA reductions of the different compounds of a natural matrix is an adequate measure of the antioxidant potential of individual molecules. This observation led us to consider three important points of concern. First, about the expression of the spiking results in terms of PA reductions: could it not be more appropriate to work on molar quantities? The second point concerns the interpretation of the obtained results: is the consumption of the antioxidant compounds really providing an information on their radical scavenging capacity, especially considering that conventional colorimetric assays are primarily based on the consumption (inhibition) of the radical species? And finally, is it possible to highlight individual antioxidant potentials through the analysis of the compounds present in a natural matrix (mixture of different substances), what of synergistic considerations?

The aim of this paper is to provide answers to these questions and contribute to a better understanding of the pre-column spiking method applied to natural products. DPPH radical scavenging was selected for the study being one of the most popular assay for *in vitro* antioxidant investigations of complex samples (Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). The ability of pre-column DPPH spiking to provide information on the individual antioxidant potential of the constituents of a natural matrix was then examined. To this end, experimentations on pure compounds isolated from such a matrix and comparisons with the pre-column DPPH–HPLC method assessing antioxidant efficiency (AE) by directly monitoring the DPPH• radical were performed. The hot-water extract from red maple bark was chosen as the natural matrix. Red maple (*Acer rubrum* L.) bark has been widely used in Aboriginal Canadians traditional medicine (Geoffroy *et al.* 2017a) and recent studies have highlighted the substantial DPPH radical scavenging activities related to galloyl-glucitol derivatives, major constituents of red maple bark extract (Ma *et al.* 2016 ; Wan *et al.* 2012a). Hence, this matrix seemed interesting for the discussion of the pre-column spiking method based on the extensively used DPPH• radical.

## **IV.2. Material and methods**

### **IV.2.1. Chemicals**

HPLC grade methanol, acetonitrile, formic acid as well as L-ascorbic acid and gallic acid were purchased from Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA. Deionised water was prepared using a Nanopure Diamond water purification system (Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA, USA). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. DPPH methanolic solutions were prepared daily and stored at 4°C in darkness. Purified compounds 2,6-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (ginnalin A) and 2-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (ginnalin C) were isolated from red maple buds in our laboratory by Meda *et al.* (2017b) and their identities were confirmed by UV, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR (Nuclear Magnetic Resonance), and HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) analyses. The purity of each compound was determined to be over 99% by normalising the peak area detected at 280 nm using HPLC with diode array detector (DAD).

### **IV.2.2. Production of red maple bark extract (RMBE)**

The red maple bark extraction procedure was adapted from a previous study by Geoffroy *et al.* (2017a). Briefly, red maple bark samples were collected near St-Antoine-de-Tilly, QC, CA (46°38'40.0"N, 71°35'45.1"W; 46°38'42.2"N, 71°35'48.4"W). Air-dried bark was ground to pass a 35 mesh (500 µm) sieve and to be retained on a 60 mesh (250 µm) sieve. Approximately 1.5 kg of red maple bark powder was immersed in 15 L water at 90°C for 1h. The supernatant solution was filtered and then freeze-dried for 48h to obtain RMBE as a dried powder. RMBE was stored at -20°C in darkness prior to the experiments.

### IV.2.3. LC–HRMS analysis

In order to identify the major phenolic compounds of RMBE, molecular weights were determined using LC–HRMS. Analytical HPLC consisted of an Agilent 1100 liquid chromatography system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a binary pump, autosampler, a thermostatically controlled column compartment (30°C), DAD, and Agilent ChemStation software (Agilent Technologies). The LC separation was performed on an Agilent Zorbax SB-C18 column (4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm particle size). The major phenolic compounds were monitored at 280 nm. The mobile phases consisted of A (water/formic acid 95/5) and B (acetonitrile/methanol/water 90/5/5), the optimised solvent gradient was: 0% B at 0–3 min, 0–6% B at 3–25 min, 6–15% B at 25–35 min, 15% at 35–48 min, 15–60% B at 48–55 min, with a 0.7 mL/min flow rate, based on the gradient used for hot-water red maple bud extract (Meda *et al.* 2017b). Using an electrospray interface and an Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies) equipped with MassHunter Workstation software (Agilent Technologies), ESI-QTOF-MS analysis was performed in positive mode using full scan mode with a mass range of 100–1000 Da. The HRMS parameters were as follows: drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate, 5.0 L/min; drying gas temperature, 325°C; nebulizer, 30 psi; capillary voltage, 4000 V; fragmentor 175 V; skimmer voltage, 65 V; and octopole radio frequency, 250 V.

### IV.2.4. Pre-column DPPH spiking analyses

#### *Experimental conditions*

Experiments were carried out on the same Agilent 1100 liquid chromatography system (Agilent Technologies), with mobile phases A (water/formic acid 95/5) and B (acetonitrile/methanol/water 90/5/5) at a flow rate of 0.7 mL/min.

First, the standard DPPH spiking procedure was applied to the extract. The RMBE sample was eluted according to the method used for LC–MS analysis: 0% B at 0–3 min, 0–6% B at 3–25 min, 6–15% B at 25–35 min, 15% at 35–48 min, 15–60% B at 48–55 min. The sample preparation consisted in dissolving RMBE (final concentration of 0.5 mg/mL) in 200 µL water, adding 800 µL methanol then mixing with 1.5 mL DPPH in methanol (final concentration of 0.8 mg/mL). The blank sample was made by substituting the DPPH solution with methanol. After 30 min in the dark at room temperature and then passing through a 0.45 µm filter, 10 µL of the RMBE sample was injected for HPLC analysis at 280 nm (Tang *et al.* 2008).

The spiking method applied to pure compounds required isocratic elution with respectively 0% B for ascorbic acid, 1% B for gallic acid, 6% B for ginnalin C and 15% B for ginnalin A. The pure compounds were suspended in 800 µL methanol before adding 200 µL water and 1.5 mL DPPH in methanol (0.8 mg/mL). Blanks were made by substituting the DPPH solution with methanol for all studied concentrations: 0.1, 0.3, 0.6, 0.75, 1, 1.25 mg/mL for ginnalin A, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.65 mg/mL for ginnalin C, 0.035, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 mg/mL for gallic acid and 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4 mg/mL for ascorbic acid. Following

the incubation and filtration steps described earlier, 5  $\mu$ L of the pure compound samples were injected in the HPLC.

Compounds when in the extract (ginnalin A, ginnalin C, gallic acid) were monitored by performing DPPH spiking applied to RMBE at several concentrations (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 5, 10, 15 mg/mL) according to the standard procedure. The evaluation of the respective quantities of ginnalin A, C and gallic acid in the RMBE was based on the quantification study reported for the red maple bud extract by Meda *et al.* (2017b).

The DPPH spiking procedure was also applied to an equimolar mixture of ginnalin A, C and gallic acid (each at final concentration 0.61 mM) for further investigation of the matrix/*mixture* effects.

### ***Expression of the results***

DPPH spiking was first assessed by PA reduction percentages (individual reductions for each compound of the extract) (Meda *et al.* 2017a ; Olennikov *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2016), according to **Eq IV.4**:

$$\%_{\text{PA reduction}} = \frac{(PA_{\text{blank}} - PA_{\text{sample}})}{PA_{\text{blank}}} \times 100 \quad (\text{IV. 4})$$

where  $PA_{\text{blank}}$  is the peak area of a compound before spiking and  $PA_{\text{sample}}$ , the peak area of the same compound after spiking. Thereafter, the molar amount reacted (MAR) of compounds either pure, in a mixture or in the extract was preferred to assess the spiking results. Individual differences between PAs before and after reaction with DPPH solution were estimated, converted into molar amounts, and then normalised by the injected amount of DPPH $\bullet$  ( $DPPH_{\text{inj}}$ ) according to **Eq IV.5**:

$$\text{MAR} = \frac{(PA_{\text{blank}} - PA_{\text{sample}})}{S_{\text{blank}} \times DPPH_{\text{inj}}} \quad (\text{IV. 5})$$

where  $S_{\text{blank}}$  (expressed in  $\text{mol}^{-1}$ ) is the slope of the quantification curve established using blank samples at different concentrations for each compound.  $DPPH_{\text{inj}}$  is expressed in mol.

### **IV.2.5. Pre-column DPPH–HPLC analysis for antioxidant efficiency (DPPH–HPLC/AE)**

Analytical HPLC consisted of the same HPLC apparatus previously described. The DPPH–HPLC/AE method was optimised based on the works of Chandrasekar *et al.* (2006) and Yamaguchi *et al.* (1998). Isocratic elution was carried out with methanol/water (85:15 v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The DPPH $\bullet$  peak was monitored at 516 nm. The difference between the DPPH $\bullet$  peak area (PA) of the blank and the DPPH $\bullet$  PA of the sample was used to evaluate the percentage of radical scavenging due to the sample according to the following equation (**Eq IV.6**):

$$\%_{\text{scavenging}} = \frac{(PA_{\text{blank}} - PA_{\text{sample}})}{PA_{\text{blank}}} \times 100 \quad (\text{IV. 6})$$

Samples were prepared by dissolving ginnalin A (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 mg/mL), ginnalin C (0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14 mg/mL), gallic acid (0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL) and ascorbic acid (0.025, 0.05, 0.075, 0.01, 0.125, 0.15 mg/mL) in 200  $\mu$ L water. Blank samples were prepared by replacing the pure compound solution by 200  $\mu$ L water. For each sample, 800  $\mu$ L methanol and 1.5 mL DPPH in methanol (final concentration of 0.8 mg/mL) were added. The mixture was then vortexed vigorously for few seconds and kept in the dark for 30 min at room temperature. After filtration through a 0.45  $\mu$ m membrane filter, 20  $\mu$ L of the sample was injected for HPLC analysis.

According to the same procedure, a tertiary mixture with each compound at its respective  $EC_{50}/3$  (0.04 mM for ginnalin A, 0.09 mM for ginnalin C and 0.05 mM for gallic acid) was subjected to DPPH–HPLC/AE analysis in order to evaluate the potential synergistic, additive or antagonistic effect of the mixture.

#### IV.2.6. Data processing

All the pre-column DPPH–HPLC/AE and DPPH spiking experiments were conducted in triplicate and data were expressed as means  $\pm$  standard deviations. SAS software, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used in order to examine statistical significance by ANOVA followed by protected LSD (least significant difference) test and to conduct correlation analysis (significance level,  $\alpha = 0.01$ ). Graphical representations were produced using MS Office 2016, Excel, PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Curve fitting was carried out using Fityk 0.9.8 (Wojdyr 2010).

### IV.3. Results and discussion

#### IV.3.1. Identification of major phenolic compounds

Based on the work of Meda *et al.* (2017b) on hot water extracts from red maple buds, the structures of compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **11**, **12** (*Table IV.1*) were identified as: 3-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexin A (**1**); gallic acid (**2**); 4-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexin B (**3**); 6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnalin B (**4**); 2-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnalin C (**6**); 3,6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnalin 3,6 (**8**); 2,4-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexin D (**11**); and 2,6-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnalin A (**12**), the major constituent of RMBE. These structures were elucidated by comparisons with data from red maple bud extract for which matching compounds were purified and identified by HRMS and NMR (Meda *et al.* 2017b). Matching experimental masses, formulas (using the same LC–HRMS apparatus), UV spectra and retention times (using the same HPLC apparatus and a similar gradient method) were confirmed for the compounds from both extracts.

Compounds **5**, **7**, **9** were labelled as di-galloyl-glucitol derivatives. The formulas generated from masses close to 468.0904 Da and the UV spectra (*Table IV.1*) were characteristic of maplexin-like compounds based on a glucitol core linked to two galloyl groups. Among these compounds, one is likely to be 2,3-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexin C as it was previously identified in red maple bark

methanolic extracts (Wan *et al.* 2012a). The other two compounds are expected to be the remaining 3,4- and 4,6-di-galloyl-glucitol analogues but have yet to be confirmed.

The spectral characteristics of compound **10** only allowed for assumptions about its structure (**Table IV.1**). The absorbance maximum near 275 nm is indicative of a galloyl glycoside, mass spectrometry provided a calculated mass of 484.1217 Da matching the formula C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>13</sub> which might correspond to 3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenol-1-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*-galloyl) glucopyranoside. However, this structure has never been reported in the genus *Acer*. Thus, compound **10** was labelled as unknown.

Table IV.1: LC–HRMS determination of phenolic compounds in red maple bark extract and associated peak area (PA) reduction after DPPH spiking. Compounds with peak no. 1–12 were detected in positive ion mode.

Peak No.	t <sub>(R)</sub> (min)	UV <sub>DAD</sub> $\lambda_{\max}$ (nm)	m/z (Da)	[M] (Da)		Error (ppm)	Formula	Proposed compound	PA reduction (%) <sup>a</sup>	
				Measured	Calculated					
<b>1</b>	6.80 ± 0.06	274	339.0692 [M+Na] <sup>+</sup>	316.0800	316.0794	-1.82	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Maplexin A	60.5 ± 3.5	C
<b>2</b>	9.08 ± 0.03	272	171.0295 [M+H] <sup>+</sup>	170.0223	170.0215	-4.32	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Gallic acid	75.9 ± 2.6	B
<b>3</b>	14.82 ± 0.03	275	317.0872 [M+H] <sup>+</sup>	316.0800	316.0794	-1.70	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Maplexin B	62.9 ± 4.7	C
<b>4</b>	20.52 ± 0.02	274	317.0893 [M+H] <sup>+</sup>	316.0820	316.0794	-8.09	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Ginnalin B	75.4 ± 1.3	B
<b>5</b>	21.54 ± 0.02	276	469.0964 [M+H] <sup>+</sup>	468.0891	468.0904	2.69	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Di-galloyl-glucitol derivative	77.1 ± 5.5	B
<b>6</b>	23.33 ± 0.02	274.5	317.0895 [M+H] <sup>+</sup>	316.0822	316.0794	-8.83	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Ginnalin C	75.8 ± 1.0	B
<b>7</b>	31.83 ± 0.02	276	469.0984 [M+H] <sup>+</sup>	468.0912	468.0904	-1.63	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Di-galloyl-glucitol derivative	78.5 ± 0.9	B
<b>8</b>	34.69 ± 0.03	274	491.0794 [M+Na] <sup>+</sup>	468.0901	468.0904	0.55	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Ginnalin 3,6	87.0 ± 3.0	A
<b>9</b>	36.82 ± 0.03	275	491.0798 [M+Na] <sup>+</sup>	468.0906	468.0904	-0.42	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Di-galloyl-glucitol derivative	87.3 ± 1.1	A
<b>10</b>	37.70 ± 0.03	276	485.1291 [M+H] <sup>+</sup>	484.1217	484.1217	-0.10	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	Unknown	77.5 ± 3.3	B
<b>11</b>	38.38 ± 0.02	276	491.0797 [M+Na] <sup>+</sup>	468.0904	468.0904	-0.12	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Maplexin D	86.1 ± 1.9	A
<b>12</b>	41.54 ± 0.01	275	469.0996 [M+H] <sup>+</sup>	468.0923	468.0904	-4.07	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	Ginnalin A	87.9 ± 3.1	A

<sup>a</sup> Expressed as PA reduction percentages,  $PA_{\text{blank}} - PA_{\text{sample}}/PA_{\text{blank}}$  (Eq IV.4) for each compound of the extract (0.5 mg/mL) at 280 nm. Data expressed  $\pm$  SD, different letters (A, B, C) traduce significant difference ( $p < 0.01$ ) according to LSD test.

### IV.3.2. DPPH spiking analysis of RMBE

The DPPH spiking method is mainly used for the screening of antioxidant compounds in natural matrices (Tang *et al.* 2008). This technique is of great interest as it avoids application of tedious preparative and isolation techniques. Among pre-column and on-line DPPH methods, spiking is considered the most efficient and sensitive method for compounds with low HPLC separation resolution (Zhang, Y.-P. *et al.* 2012). Therefore, pre-column DPPH spiking seemed appropriate for the study of the 12 major phenolic compounds of RMBE monitored at 280 nm (**Table IV.1**). Those compounds being galloyl derivatives exhibit short reaction times with the DPPH<sup>•</sup> radical (Schaich *et al.* 2015); a 30-min incubation time assures a steady state before measurement thus avoiding any kinetics interference. The RMBE concentration for the experiment (0.5 mg/ml) was chosen to ensure significant peak reductions while avoiding any peak disappearance for relevant comparisons of the respective reductions. For each compound, a significant peak area (PA) reduction is observed. The visual observation (Tang *et al.* 2008 ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012) of **Figure IV.1a** and the individual PA reduction percentages (Meda *et al.* 2017a ; Olennikov *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2016) displayed in **Table IV.1** are the usual two ways of ascertaining the antioxidant (radical scavenging) efficiency of the compounds. In RMBE, using the common interpretation, all the galloyl derivatives seem to exhibit some antioxidant potential. Furthermore, the noticeable differences between the respective reduction values (**Table IV.1**) suggests significantly superior antioxidant efficiencies for compounds 8, 9, 10, 11 ( $p < 0.01$ ). Yet, the basis for this interpretation seems quite questionable.

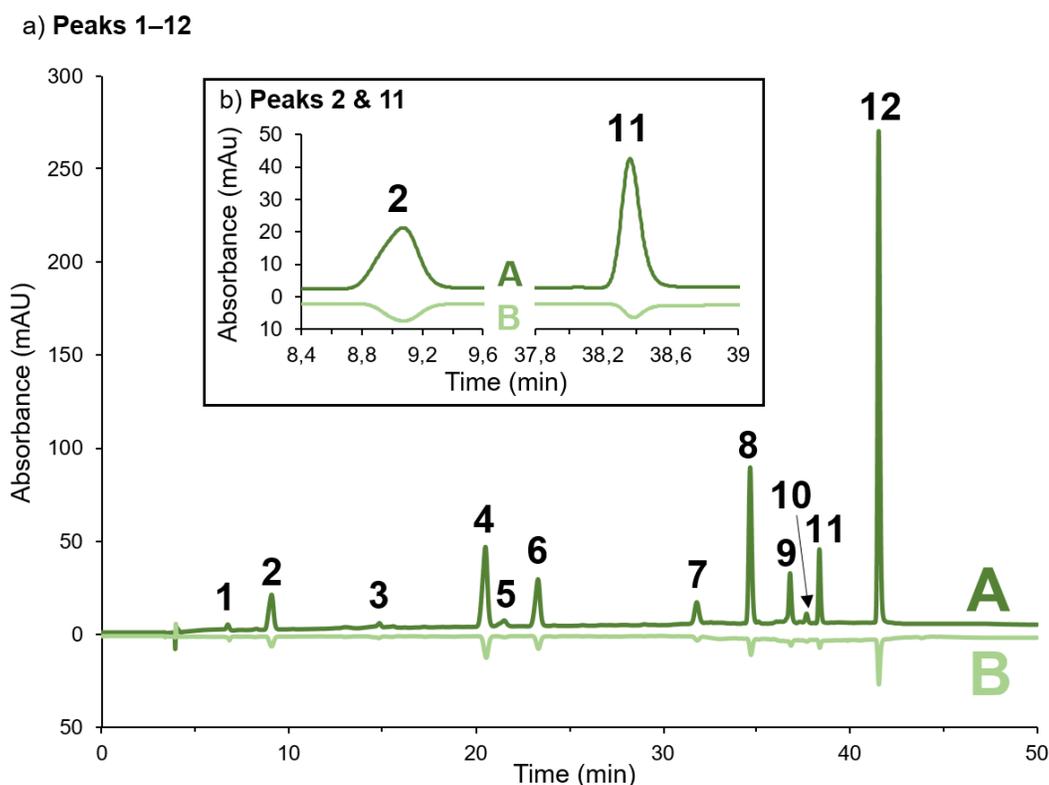


Figure IV.1: Chromatograms of HPLC-DAD (280 nm) before reaction (A) and DPPH spiking (280 nm) after reaction (B) of red maple bark aqueous extract (0.5 mg/mL). Peaks 1–12 (a), peaks 2 & 11 (b) c.f. Table IV.1.

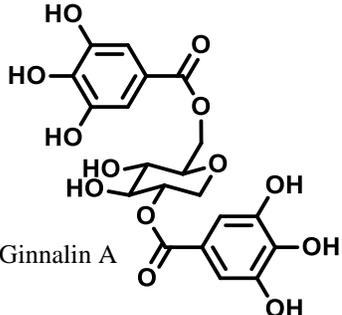
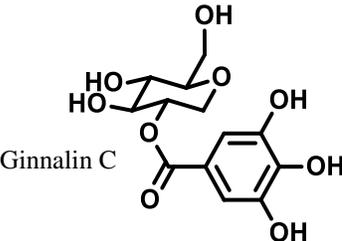
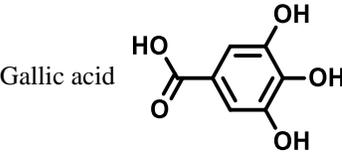
### IV.3.3. Significance of the DPPH spiking method

As previously suggested, the interpretation of the antioxidant efficiency using the spiking method may be based on contradictory information. It seems that assessing radical scavenging by simply monitoring phenolic compounds using PA reductions could be misleading since the real information on DPPH radical scavenging is directly provided by monitoring DPPH<sup>•</sup> itself. To illustrate this problem, the zoomed chromatogram of compounds 2 and 11 from RMBE is displayed in *Figure IV.1b*. In this case, the PAs of compounds 2 and 11 are similar (respectively 331.9 and 328.9, not significantly different at 0.01). Nevertheless, after reaction with DPPH<sup>•</sup>, the PA of compound 11 has decreased more than that of compound 2 (PA reductions of 86.1% and 75.9% respectively, significantly different at 0.01, *Table IV.1*). The logical conclusion would be that compound 11 reacts more with the radical than 2. Additionally, as no information on the amount of DPPH<sup>•</sup> scavenged by each compound is available, two contradictory conclusions can be stated. Either, a) compound 11 is a better radical scavenger than 2, or on the contrary, b) compound 2 is a better radical scavenger than 11. The first scenario (conclusion a) is usually chosen to interpret the results of the DPPH spiking method. The higher reacted amount of compound 11 is then associated with a larger conversion of DPPH<sup>•</sup>. Still, this conclusion does not take stoichiometry into account. If considered, stoichiometry could lead to the exactly opposite explanation (conclusion b). In other words, assuming that compound 2 exhibits a higher stoichiometry than 11, the smaller reduction of its PA would mean that a smaller amount is needed to scavenge as much or more DPPH<sup>•</sup>. In this case, compound 11 would be more reacted (larger PA reduction for less DPPH<sup>•</sup> scavenged) but 2 would be more scavenging (smaller PA reduction for more DPPH<sup>•</sup> scavenged).

In addition to the standard spiking interpretation not including stoichiometry considerations, the relevance of using PA reductions to express the results seems also questionable. To ascertain the significance of the PA reductions for compounds in RMBE, those were compared to the corresponding molar amounts reacted (MAR values). Normalised by the amount of DPPH<sup>•</sup> injected (*Eq IV.5*), MAR is expressed in the same units as stoichiometry values (mol/mol<sub>DPPH</sub>). Three different compounds (ginnalin A, ginnalin C and gallic acid) were selected among the 12 galloyl derivatives of the RMBE based on their differences in terms of structure, quantity in the extract (*Table IV.2*) and PA reductions (*Table IV.1*) in order to limit bias. Considering the three compounds in the extract at 0.5 mg/mL, the results seem to follow a similar trend justifying the use of PA reductions. Ginnalin A exhibits a higher PA reduction (87.9%) than those of ginnalin C (75.8%) and gallic acid (75.9%), non-significantly different at 0.01 (*Table IV.1, Figure IV.2*). When converted in MAR, ginnalin A (0.058 mol/mol<sub>DPPH</sub>) is still superior to ginnalin C (0.020 mol/mol<sub>DPPH</sub>) and gallic acid (0.019 mol/mol<sub>DPPH</sub>) which are statistically identical ( $p < 0.01$ ). Nevertheless, these results are only valid for the 0.5 mg/mL RMBE concentration as highlighted in *Figure IV.2*. When comparing with higher concentrations, this trend changes significantly. The PA reduction values for gallic acid are becoming closer to those of ginnalin A than those of ginnalin C, while significantly decreasing. A different pattern is observed for MAR. While hardly increased for gallic acid and ginnalin C, MAR values remain similar through RMBE concentrations. Compared to those, ginnalin A exhibits higher values, allowing to keep the same order of reactivity of the compounds for all the studied RMBE concentrations. Consequently, MAR

values can be considered more reliable than PA reduction, providing a better significance in assessing the spiking results.

Table IV.2: Proportion in red maple bark extract and DPPH scavenging values for selected compounds ginnalin A, ginnalin C and gallic acid (ascorbic acid used as control).

	wt% in extract (%) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	1/n <sup>b</sup>	Regression equations <sup>c</sup>
 Ginnalin A	12.2 ± 0.2 A	0.066 ± 0.001 A	0.142 ± 0.003 A	$y = 6.627x + 0.060$ $r^2 = 0.989$
 Ginnalin C	3.4 ± 0.3 B	0.132 ± 0.002 C	0.258 ± 0.003 C	$y = 3,980x - 0,025$ $r^2 = 0,999$
 Gallic acid	1.8 ± 0.1 C	0.076 ± 0.001 B	0.151 ± 0.002 B	$y = 6,617x$ $r^2 = 0,996$
Ascorbic acid	-	0.217 ± 0.005 D	0.443 ± 0.005 D	$y = 2.249x + 0.019$ $r^2 = 0.995$

<sup>a</sup> Weight percentage (w/w) of each compound in the extract. <sup>b</sup> Expressed as mol of compound/mol<sub>DPPH</sub> injected (MAR).

<sup>c</sup> Regression equations of curve fitting data (cf. Figure IV.4). Data expressed ±SD, different letters (A, B, C, D) traduce significant difference ( $p < 0.01$ ) according to LSD test.

Finally, it still proves to be difficult to conclude on the individual scavenging potential of the compounds in a natural extract using DPPH spiking. Several phenomena are likely to interfere: matrix effect, possible synergistic effect (Peyrat-Maillard *et al.* 2003 ; Tsimogiannis *et al.* 2017), differences in respective quantities of compounds and as discussed, differences in terms of reactivity and stoichiometry. Not being a panacea, the DPPH spiking method is still used to provide an estimation of the antioxidant efficiency (Meda *et al.* 2017a ; Olennikov *et al.* 2014 ; Qi *et al.* 2016 ; Zhang, Y.-P. *et al.* 2012), criterion mostly evaluated through EC<sub>50</sub> or stoichiometry values for pure compounds. While the stoichiometry is determined by monitoring the radical species, the spiking method monitors the compounds remaining after scavenging. It was then interesting to verify the suitability of the DPPH spiking method based on MAR for antioxidant

screening, by evaluating the stoichiometry (*i.e.* antioxidant efficiency) of the compounds. DPPH spiking applied to the selected pure compounds was compared to DPPH–HPLC/AE, another pre-column method based on the direct monitoring of DPPH• (similarly to the standard spectrophotometric assay) often chosen for its reliability to provide direct information on the stoichiometry (Chandrasekar *et al.* 2006 ; Tang *et al.* 2008 ; Yamaguchi *et al.* 1998).

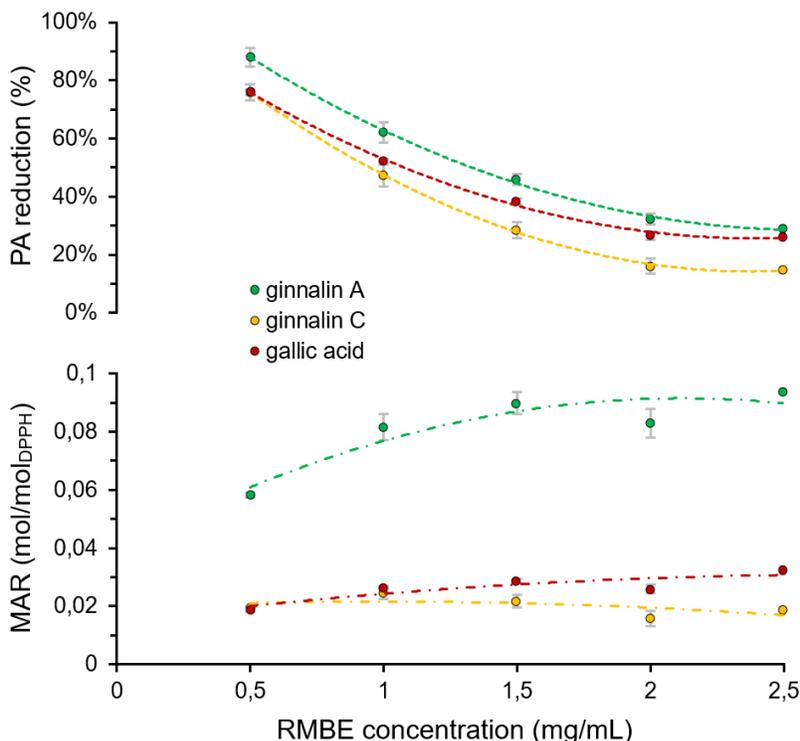


Figure IV.2: Scatter plot of ginnalin A, ginnalin C and gallic acid peak area (PA) reduction percentages and the corresponding molar amounts reacted (MAR) in the extract versus the final concentration of red maple bark extract (mg/mL) following DPPH spiking. PA reduction percentages expressed as  $PA_{blank} - PA_{sample} / PA_{blank}$  (Eq IV.4) and MAR as mol of compound/mol of DPPH• injected for each compound in the extract at 280 nm. SD for each point based on three independent experiments.

#### IV.3.4. DPPH–HPLC/AE experiments

##### *Optimisation of the method*

Compared to the standard assay performed spectrophotometrically, using an HPLC method to evaluate the DPPH radical scavenging capacity of the phenolic compounds from red maple bark allows to distinguish the radical DPPH• from its reduced form, DPPH–H. Even if 516 nm is not specific of DPPH–H (Figure IV.3a), the molar extinction coefficient of the hydrazine analogue of DPPH• is not nil at this wavelength. As such, a corresponding absorbance peak with a shorter retention time than DPPH• (Yamaguchi *et al.* 1998) can be identified by its UV spectrum (Friaa et Brault 2006). Several DPPH–HPLC/AE trials have shown that an extended retention time and contact with water had a negative incidence on DPPH• peak area, as water is known to lower DPPH• stability (Foti 2015). Thus, methanol/water (85:15 v/v) was chosen as the optimal mobile phase. It allowed a short retention time of 5.5 min but a mitigated separation of DPPH–H and

DPPH• peaks. The PA of DPPH–H is low when injecting the DPPH• blank (**Figure IV.3b**) or a low concentration of RMBE and pure compounds (**Figure IV.3c**) and is not usually taken into account (Chandrasekar *et al.* 2006). However, an opposite trend can be observed when the concentration of the extract or this of the pure compounds increases within the sample. In this case, the PA of DPPH–H is far from negligible and has to be considered (**Figure IV.3d**). In the study by Chandrasekar *et al.* (Chandrasekar *et al.* 2006) performed using similar column dimensions, DPPH–H and DPPH• peaks were overlapped and thus DPPH• inhibition has been measured by dosing both forms. In order to better differentiate those two peaks (almost completely separated using our optimised mobile phase) and therefore improve the measurement of the DPPH radical scavenging, curve fitting was applied on raw chromatographic data (**Figure IV.3b, c, d**). Best fits were attained with the first peak (DPPH–H) being modelled as a Gaussian function and the second peak (DPPH•) as a lognormal function with slight asymmetry. The fitting accuracy was controlled by a coefficient of determination  $r^2 \geq 0.999$  between fits and raw chromatograms data.

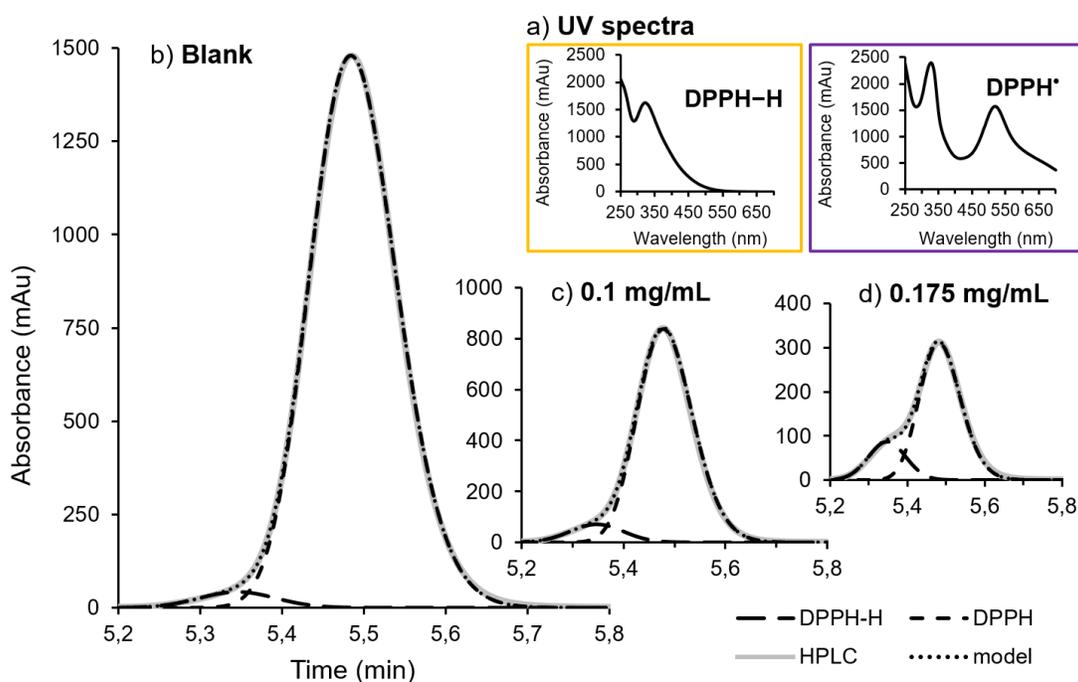


Figure IV.3: UV spectra of DPPH• and DPPH–H (a) and DPPH–HPLC/AE chromatograms (516 nm) in presence of ginnalin A at 0  $\mu\text{g/mL}$  (b), 0.1 mg/mL (c), 0.175 mg/mL (d). Modelled curves providing DPPH• and DPPH–H peaks fit raw chromatograms with  $r^2 \geq 0.999$ .

#### Stoichiometry determination by DPPH–HPLC/AE

As before, three compounds from RMBE, ginnalin A, ginnalin C and gallic acid were selected based on their singularities in terms of structures (occurrence of galloyl groups, glucitol core), respective quantities in the extract (unlike for ginnalin A, the concentrations of ginnalin C and gallic acid are not among the largest) and PA reductions during DPPH spiking (**Table IV.1**).  $\text{EC}_{50}$  values of the three selected galloyl derivatives and the control (ascorbic acid) displayed in **Table IV.2**, are similar with or without curve fitting and consistent with those obtained by colorimetric assay in other works (Ma *et al.* 2016 ; Wan *et al.* 2012a). Even though,  $\text{EC}_{50}$  is useful to compare experimental values with literature data, stoichiometry (antioxidant efficiency, AE)

was chosen to provide the reference values for this study. Stoichiometry appears indeed more reliable as it directly provides the amount of the compound needed to achieve a complete reaction with DPPH\*.

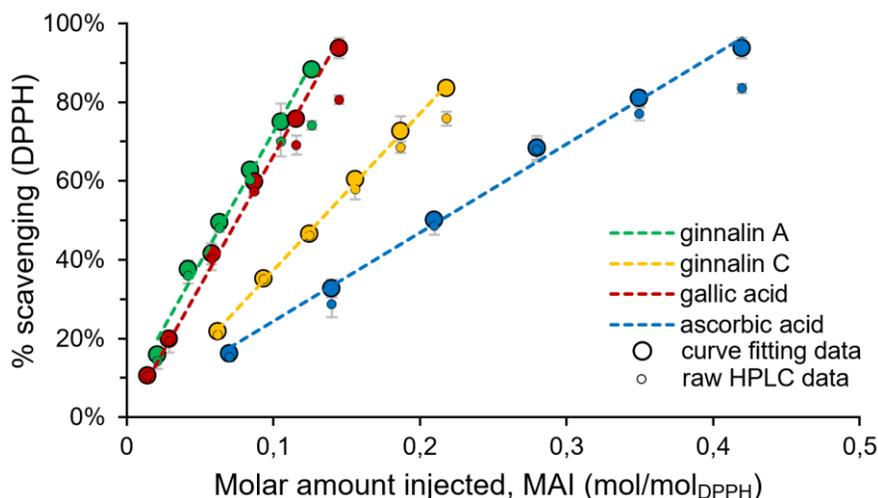


Figure IV.4: Scatter plot of the DPPH scavenging percentage versus MAI, the respective amounts of ginnalin A, ginnalin C, gallic acid and ascorbic acid injected (expressed as mol of compound/mol of DPPH\* injected), after DPPH–HPLC/AE. Data obtained by curve fitting of raw HPLC data (○), raw HPLC data (●). SD for each point based on three independent experiments.

Curve fitting turned out to be useful for determining the stoichiometry of the selected galloyl derivatives. The difference between quantifying both DPPH–H and DPPH\* or solely the radical DPPH\* is highlighted in **Figure IV.4**, as a significant divergence occurs between each raw data curve and the curve-fitted data. The divergence observed induces a nonlinear evolution of the DPPH\* inhibition against the MAI (the molar amount injected normalised by the molar amount of DPPH\* injected) for pure compounds in solution. This can cause a non-trivial determination of the stoichiometry (Ma *et al.* 2016 ; Tsimogiannis *et al.* 2017). For that reason, stoichiometry ( $1/n$  with  $n$ , the stoichiometric factor) is usually calculated as  $1/n = 2 \times EC_{50}/DPPH^*$  injected (mol/mol<sub>DPPH</sub>) (Foti 2015). Nonetheless, this linear formula is only valid if the evolution of the DPPH\* inhibition is also linear (function fixes the origin). This is not always the case, in particular for ginnalin A (Ma *et al.* 2016), as illustrated by the regression curves represented in **Figure IV.4** and their respective equations (**Table IV.2**). In our case, data after curve fitting provide satisfactory linearity even at high scavenging percentage. It allowed us to use the regression equations instead of the previous formula to calculate the stoichiometry values ( $1/n$ ) shown in **Table IV.2**.

Based on these reliable estimations of the stoichiometry (AE) of ginnalin A, C, gallic acid and ascorbic acid, DPPH spiking was tested for comparison purposes. These four pure compounds were studied to determine if the calculated AE values were attainable by using this spiking method and *a fortiori*, if the method is able to provide usable information for antioxidant screening.

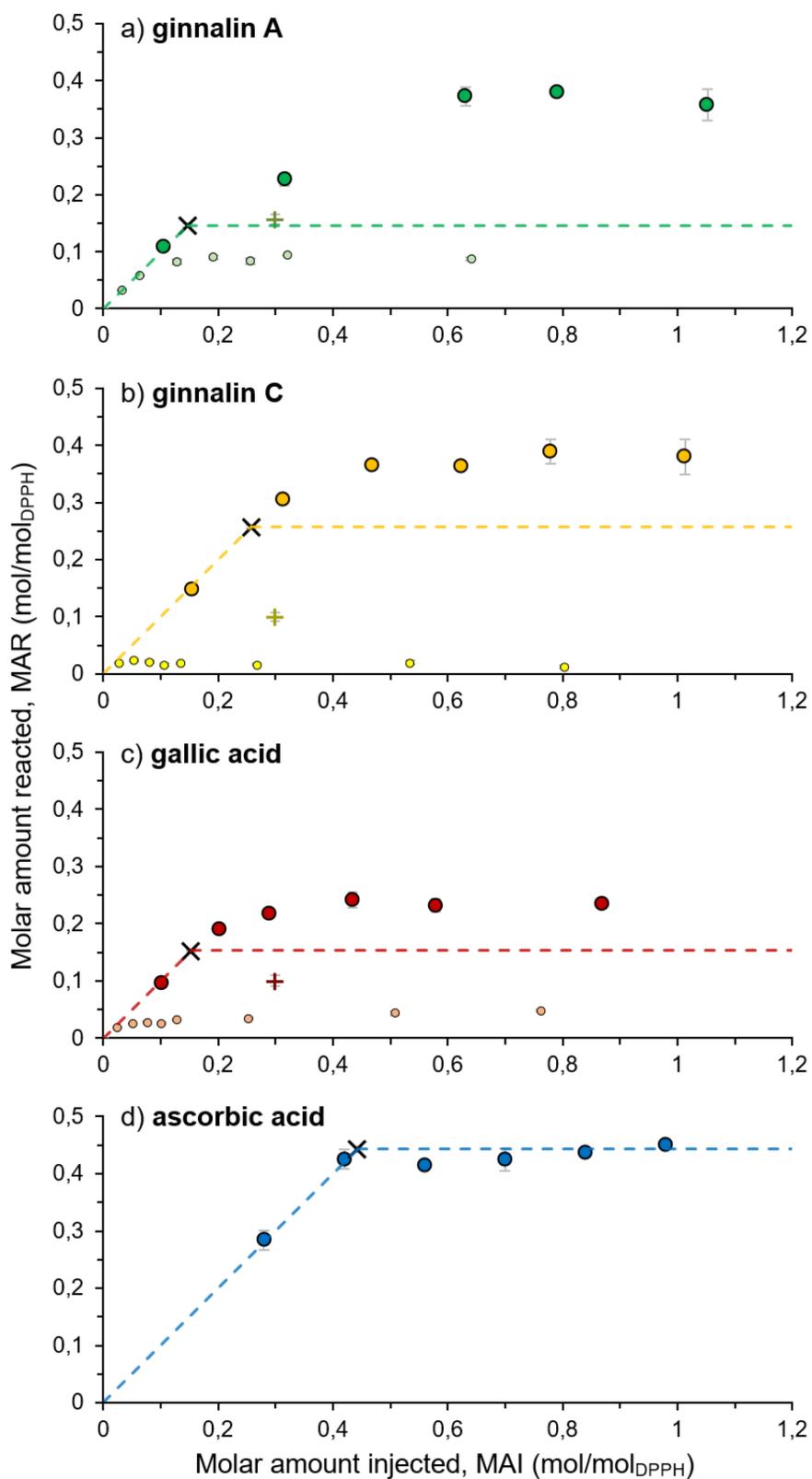
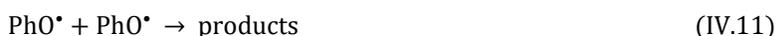


Figure IV.5: Scatter plots of the amount of ginnalin A (a), ginnalin C (b), gallic acid (c) and ascorbic acid (d) reacted (MAR) versus MAI, the respective amounts injected (all expressed as mol of compound/mol of DPPH' injected), following DPPH spiking. Stoichiometry ( $\times$ ), complete reaction (---), pure compounds ( $\circ$ ), compounds in extract ( $\bullet$ ), compounds in equimolar mixture ( $+$ ). SD for each point based on three independent experiments.

### IV.3.5. DPPH spiking applied to pure compounds

To our best knowledge, while largely reported for natural matrices, the pre-column spiking methods have never been implemented using pure compounds for review. The previous calculation of the stoichiometry values for ginnalin A, ginnalin C, gallic acid and ascorbic acid allowed us to assess MAR, the reacted amount for which either each compound or the radical DPPH• are entirely converted. Thus, this theoretical amount was plotted as reference on **Figure IV.5a, b, c, d** and labelled as *complete reaction*. From that, the DPPH spiking results for the three galloyl derivatives exhibited similar patterns. Contrary to ascorbic acid for which a slope break is observed near the stoichiometry, the experimental values for ginnalin A, C and gallic acid cannot allow to spot the same stoichiometry (AE) values as determined when using DPPH–HPLC/AE (**Figure IV.5**). These results highlight the critical impact of the molecular structure on the ability to assess antioxidant efficiency by the spiking method. DPPH spiking seems unsuitable for galloyl derivatives, casting doubt on its suitability for phenolic compounds or phytochemicals in general.

Still, the method was found useful to study the autoxidation of the pure galloyl derivatives, a phenomenon scarcely reported for experimental studies on phenolics (Foti 2007 ; Sang *et al.* 2005 ; Yoshioka *et al.* 1991), but never observed nor considered when applying the spiking method. Beyond their respective stoichiometric conditions, ginnalin A, C and gallic acid, are still reacted in the sample and exhibit higher MAR values than expected (**Figure IV.5**). Then, it seems that others substances aside from DPPH•, can oxidise pure phenolic acid (galloyl) derivatives. In protic solvents such as methanol, the reaction of a phenolic acid (PhOH) on the DPPH• radical consists of a fast electron-transfer (SPLET) from phenoxide anions (PhO<sup>-</sup>) to the radical (**Eq IV.7, Eq IV.8**) (Foti 2007 ; Foti *et al.* 2004 ; Friaa et Brault 2006 ; Ingold et Pratt 2014):



Despite being involved in an acid-base equilibrium (**Eq IV.9**), the hydrazine analogue DPPH–H is stable (Chandrasekar *et al.* 2006), a negligible amount of its conjugate base DPPH<sup>-</sup> is usually detected (Friaa et Brault 2006). DPPH–H is therefore unlikely to react with pure phenolic acids. In addition, secondary reactions (**Eq IV.10, Eq IV.11**) are generally considered to be of limited occurrence (Mishra *et al.* 2012). These considerations led us to hypothesize that some PhO• radicals are bound to remain in the reaction media and are thus available to oxidise PhOH (or PhO<sup>-</sup>) present in excess, according to **Eq IV.12**. Autoxidation is reported for phenolic compounds and for galloyl derivatives *e.g.*, epigallocatechin gallate (Foti 2007 ; Sang *et al.* 2005 ; Yoshioka *et al.* 1991), explaining the results observed for the selected galloyl compounds from RMBE (**Figure IV.5**). However, experimental studies of this phenomenon, in particular in the context of radical scavenging are of very limited occurrence.



In conclusion, using DPPH spiking for estimating the MAR values of the compounds does not provide any information on the contribution of DPPH<sup>•</sup> to the total reactivity observed, as the reactivity of the species produced is not considered.

**Figure IV.5** also shows that when monitored in the RMBE, the galloyl derivatives do not exhibit autoxidative behaviour. On the contrary, ginnalin A, C and gallic acid reach a steady state before attaining the stoichiometric conditions due to the contribution from other compounds of the extract to the DPPH radical scavenging. Thus, even if the DPPH spiking method allows for the determination of the stoichiometry for pure ascorbic acid, less satisfactory results can be expected for ascorbic acid blended in natural matrices. The absence of autoxidation for the compounds monitored in the RMBE could be explained by matrix effects, considering that PhO<sup>•</sup> radicals may indiscriminately oxidise substances in the extract (phenolics, carbohydrates, proteins (Trombley *et al.* 2011)). However, it may be merely due to the contribution of the phenolic compounds alone, as galloyl derivatives are well-known for their high reactivity (Ma *et al.* 2016 ; Wan *et al.* 2012a). Based on this hypothesis, tertiary mixtures of galloyl derivatives were studied to reveal a possible synergistic effect (*mixture effect*) (Foti 2007 ; Tsimogiannis *et al.* 2017).

#### IV.3.6. Exploration of the *mixture effect*

The case of an effect induced by the interactions between phenolic compounds has been investigated using both pre-column DPPH spiking and DPPH–HPLC/AE methods. This effect is referred to as a *mixture effect* in order to distinguish it from what is generally called matrix effect (interferences from all substances in the matrix). The *mixture effect* can be attributed to the regeneration of one or several antioxidant phenolic compounds from the RMBE. The effect would be either antagonistic (the least efficient antioxidants are regenerated by the other antioxidants), additive (no regeneration or the antioxidants are equally efficient), or synergistic (the most efficient antioxidants are regenerated by the others) (Peyrat-Maillard *et al.* 2003). Aiming to study this effect while avoiding interferences from other compounds of the matrix, only ginnalin A, ginnalin C and gallic acid were kept as references and mixed in different fashions before analysis.

##### *Investigation through DPPH spiking*

This *mixture effect* was evaluated by applying DPPH spiking to an equimolar mixture of the three galloyl derivatives selected. By doing so, ginnalin A, C and gallic acid were studied above their respective stoichiometry values (for each compound, MAI value of 0.3 mol of compound/mol of DPPH<sup>•</sup> injected). In the previous part of this paper, autoxidation was observed when the pure compounds were injected under those conditions (**Figure IV.5**). However, when injecting the equimolar mixture, MAR values of  $0.156 \pm 0.007$ ,  $0.100 \pm 0.008$  and  $0.100 \pm 0.006$  mol/mol<sub>DPPH</sub> were determined for ginnalin A, ginnalin C and gallic acid respectively, as displayed in **Figure IV.5**. The corresponding data points are below (or close to) the *complete reaction* conditions (**Figure IV.5**), demonstrating no autoxidation (or to a limited extent for ginnalin

A). This significant difference with the autoxidative behaviour of the pure galloyl derivatives indicates mutual interactions of the compounds in the mixture, and explicitly highlights a *mixture effect*.

Besides, although studying only three compounds, this *mixture effect* could be extended to the other galloyl derivatives of the RMBE. Injecting 0.3 mol/mol<sub>DPPH</sub> of one of the three selected compounds, either in the equimolar mixture or in the RMBE leads to different MAR values (**Figure IV.5**). This gap of MAR seems mainly due to the contribution of the 9 other galloyl derivatives (**Table IV.1**) from the RMBE. Known for their comparable DPPH scavenging activities (Ma *et al.* 2016 ; Wan *et al.* 2012a), those 9 galloyl derivatives are bound to compete with ginnalin A, C and gallic acid causing less scavenging and thus lower MAR values for the three selected compounds. Despite this gap, MARs of compounds in the mixture and in the RMBE (at MAIs of 0.3 mol/mol<sub>DPPH</sub>) follow a similar trend confirmed by a high correlation ( $r = 0.943$ ,  $r^2 = 88.9\%$ ,  $p < 0.0001$ ). Yet, the respective quantities of ginnalin A, C and gallic acid either in the equimolar mixture or in the extract are different. As such, this high correlation suggests that quantity does not seem to influence the order of reactivity for these compounds.

In summary, applying the DPPH spiking method to an equimolar tertiary mixture of galloyl compounds highlighted important findings: occurrence of a *mixture effect*, limited autoxidation and no quantity effect. Those could require some confirmation by studying more galloyl derivatives of the RMBE or even a complete phenolic reconstitution of the extract. However, considering the complexity to obtain such samples, we chose to focus on the characterisation of the *mixture effect* limited to the tertiary mixture of ginnalin A, C and gallic acid.

#### ***Characterisation by DPPH–HPLC/AE***

In order to better characterise the *mixture effect* and show either an antagonistic, an additive or a synergistic behaviour, the DPPH–HPLC/AE method was applied to another tertiary mixture of ginnalin A, C and gallic acid. The DPPH scavenging results for these three compounds in the mixture were compared to those provided by the experiments with the same three pure compounds. The tertiary mixture of ginnalin A (GinA), ginnalin C (GinC) and gallic acid (GA) was studied with each compound at its respective EC<sub>50</sub>/3 concentration; in order to approach the reaction conditions for only one pure compound at its EC<sub>50</sub> concentration. Theoretically, in these conditions a value of DPPH• inhibition inferior to 50% means an antagonistic effect. A DPPH• inhibition of 50% would induce an additive effect, while a value superior to 50% would stand for a synergistic effect. Here, to provide more significance we chose to compare the DPPH• inhibition percentage of the mixture (each compound at its EC<sub>50</sub>/3 concentration) with the sum of the three DPPH• inhibition percentages taken separately for each pure compound at its EC<sub>50</sub>/3 concentration (values obtained using the regressions from **Table IV.2**). Analysis of variance showed no significant difference between the DPPH• inhibition of the tertiary mixture (%<sub>inhib</sub> (GinA+GinC+GA) = 51.3% ± 4.8%) and the DPPH• inhibition of the sum (%<sub>inhib</sub> (GinA) + %<sub>inhib</sub> (GinC) + %<sub>inhib</sub> (GA) = 51.6% ± 0.9%). Therefore, the *mixture effect* between the three galloyl derivatives studied appears to be an additive effect. This result is in accordance with previously reported additive effects for other mixtures of phenolic compounds (Tsimogiannis *et al.*

2017). As stated before, the common explanation for an additive effect of the compounds in a mixture is either the similarity in antioxidant efficiencies, or the absence of regeneration mechanism between those constituents (Peyrat-Maillard *et al.* 2003). As previously elucidated (**Table IV.2**), ginnalin A, ginnalin C and gallic acid do exhibit different antioxidant efficiency values (both in terms of EC<sub>50</sub> and 1/*n*). Moreover, regeneration mechanisms do take place since the three galloyl compounds already demonstrated interactions with each other in order to limit autoxidation. Therefore, the additive effect observed towards DPPH radical scavenging is most likely caused by an equilibrium between the respective regeneration reactions of ginnalin A, C and gallic acid.

This is the first time that a *mixture effect* is described and thoroughly investigated using pre-column methods. The experiments in this study were only performed with three compounds; supplementary researches on more compounds with different structures would therefore be of interest to refine the characterisation of *mixture effects* or even matrix effects in natural products.

#### **IV.4. Conclusions**

The present study revealed for the first time the inadequacy of the DPPH spiking method for antioxidant screening through the example of galloyl derivatives present in the red maple bark extract (RMBE). The usual expression of the results based on the peak area (PA) reductions of the compounds in the extract demonstrated some major deficiencies; in particular by overlooking stoichiometry considerations. The original measurement presented here by using molar amount reacted (MAR) provided more significant values than the evaluation of the PA reductions. However, both expressions of the results seemed to evaluate the reactivity of the compounds involved instead of the inhibition of the DPPH• radical. Moreover, DPPH spiking applied to three pure galloyl derivatives brought out evidences of autoxidation and established that the method is unsuitable for determining the stoichiometry (*i.e.* antioxidant efficiency) of such compounds. Significant differences were observed when monitoring the pure compounds or the same compounds in the extract, indicating a matrix effect that is mainly due to the galloyl derivatives of the RMBE.

Despite the demonstrated inefficiency for antioxidant screening, the DPPH spiking method provided useful clues for better understanding the radical scavenging mechanisms involved in complex natural matrices. The reactive radical species (other than DPPH•) brought to light by the method and responsible for the autoxidation phenomenon would require further investigations. The spiking method would also benefit from considering the kinetics of the reactions involved.

#### ***Acknowledgments***

The authors are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Levaco Inc. and Decacer Inc. for financial support, to Mr. Clermont Levasseur for assistance with plant authentication, and to Mr. Pierre Audet for technical assistance and to Mr. Maxime Delangie for language editing.

## V. Chapitre 5 – Exploration d’un procédé basé sur l’ultrafiltration pour le fractionnement d’extraits à l’eau chaude

Mis à part les composés phénoliques simples explicités dans le chapitre 4, les résultats discutés dans le chapitre 3 ont montré l’importance d’autres familles de molécules au sein des extraits aqueux d’écorce des érables rouge et à sucre. Les saccharides (sucres simples, sucrose, oligo- et polysaccharides) en particulier semblent être à même de constituer un volet de valorisation pour l’écorce d’érable à sucre, moins riche en composés phénoliques. Ce volet ne sera cependant pas présenté ici et fera l’objet d’études futures. D’autre part, les tannins de hautes masses moléculaires des deux essences d’érable ont été peu étudiés au niveau quantitatif et structural (Bi *et al.* 2016). En effet, seuls des dérivés mono-ou digalloyl-glucitol de faibles masses moléculaires ont été présentés dans le chapitre 4. Outre ceux-ci, des composés similaires (*e.g.* trigalloyl-glucitol) et un nombre très restreint d’ellagitannins et de proanthocyanidines (dimères, trimère) constituent les uniques exemples de tannins caractérisés à date. L’exploration des tannins oligomériques et polymériques de dimensions plus élevées pourrait donc constituer un axe de recherche pertinent. De plus, même si les protéines semblent se retrouver en faibles quantités dans les écorces, certaines structures majoritaires sont susceptibles d’être mises en évidence (Wetzel *et al.* 1989), et mériteraient alors une caractérisation plus approfondie. En outre, une teneur plus élevée en acides aminés non dosés par méthode de Bradford est également envisageable. Enfin, la présence de saponosides chez *Acer*, la propension de l’eau chaude à extraire de tels composés et le caractère moussant de l’extrait après agitation justifie l’exploration de la présence de tels composés dans les extraits aqueux étudiés.

Pour investiguer ces types de composés, une séparation en termes de masse moléculaire par ultrafiltration a été envisagée à échelle laboratoire pilote en utilisant deux membranes de différents MWCO, l’objectif étant double : i) vérifier la capacité de l’ultrafiltration à permettre la récupération de macromolécules (tannins condensés voire hydrolysables, protéines), ii) étudier la récupération de molécules phénoliques de faibles masses moléculaires, en particulier pour les fractions de l’extrait aqueux d’écorce d’érable rouge.

Avant l’étude par ultrafiltration d’éventuels saponosides et protéines, une partie préliminaire des travaux a été consacrée à la mise en évidence de ces composés dans les extraits bruts.

## V.1. Matériel et méthodes

### V.1.1. Matériel

#### *Réactifs*

Du butanol (BuOH), de l'éthanol (EtOH), du méthanol (MeOH), de l'acétonitrile de grade HPLC, ainsi que de l'acide formique, acétique (glacial), chlorhydrique (12 N, 37%) et sulfurique (36 N), du carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), du réactif Coomassie (Bradford) et des standards de sérum d'albumine bovin (BSA) ont été achetés chez Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA. D'autres réactifs et standards : réactif de Folin-Ciocalteu, acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique (Trolox), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•), sulfate d'ammonium ferrique ( $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ), chlorure de cyanidine, galactose, fructose, rhamnose, arabinose ont été achetés chez Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Le standard d'Oligopin® a été gracieusement fourni par DRT (Purextract), Dax, France. L'eau nanopure a été préparée à l'aide d'un système de purification Nanopure Diamond (Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA, USA). Les solutions méthanoliques de DPPH• ont été préparées quotidiennement et stockées à 4°C à l'abri de la lumière.

#### *Écorces et extraits*

L'écorce des deux essences d'érable (AR, AS) a été récoltée et conditionnée comme décrit dans le chapitre 2 (Geoffroy *et al.* 2017a). Deux extraits aqueux (9 L chacun compte tenu des pertes engendrées par la séparation extrait/écorce) ont été produits à échelle laboratoire pilote (AR et AS) comme décrit dans le chapitre 3 (Geoffroy *et al.* 2017b). Ceux-ci ont servi de matériel de base pour les expériences d'ultrafiltration.

Les extraits secs des écorces des deux types d'érable ont été obtenus par osmose inverse suivie d'une lyophilisation AR OL (RO/FD) et AS OL (RO/FD) grâce à la procédure décrite aux chapitres 3 et 4 (Geoffroy *et al.* 2017b, 2017c). Ces extraits secs ont été réservés aux tests de mise en évidence des saponosides et de caractérisation des protéines.

### V.1.2. Test d'hémolyse

Le caractère modérément moussant des extraits à l'eau chaude de l'écorce des deux essences (AR, AS) nous a conduit à tester la présence de saponosides par test d'hémolyse. Ce test est basé sur l'utilisation de géloses d'agar contenant du sang. Les saponosides sont reconnus pour lyser les globules rouges du sang et ainsi induire une décoloration. Selon une procédure appliquée par Almutairi et Ali (2015), les géloses ont été préparées dans un erlenmeyer de 250 mL sous agitation, par chauffage jusqu'à ébullition de 100 mL d'une solution à 4% (m/v) d'Oxoid™ Tryptone Soy Agar (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Après stérilisation à 120°C pendant 15 min à l'autoclave, la solution a été refroidie à 45°C avant l'ajout de 7 mL de sang de mouton défibriné (Quad Five, Ryegate, MT, USA). Après homogénéisation, le mélange a été versé

dans une boîte de Petri en faisant attention d'éviter la formation de bulles, puis laissé à solidifier à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Après découpage de quatre puits dans la gélose à l'aide d'un tube creux et d'un scalpel chauffés et stériles, quatre échantillons de 70  $\mu$ L ont été injectés : de l'eau nanopure comme témoin négatif, une solution aqueuse d'un standard de saponines issues de *Quillaja saponaria* Molina, ACROS Organics™ (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) à 25 mg/mL comme témoin positif, et les deux extraits d'érable également à 25 mg/mL dans l'eau. L'observation des plaques a été effectuée au bout de 24 h à température ambiante.

### V.1.3. SDS-PAGE

La caractérisation des protéines des deux essences a été réalisée par électrophorèse (SDS-PAGE), similairement à celle mise en œuvre par Raorane *et al.* (2016). Les extraits bruts d'AR et d'AS ont été solubilisés à 80 mg/mL dans une solution de Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) diluée deux fois. L'expérience d'électrophorèse a été réalisée dans une cuve Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories) remplie à la hauteur préconisée pour deux gels d'une solution tampon Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad Laboratories) diluée dix fois. Deux plaques de gel, 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 30  $\mu$ l (Bio-Rad Laboratories) ont été utilisées. Après remplissage maximal du compartiment inter-plaques avec la même solution de Tris/Glycine/SDS diluée, 20  $\mu$ L de solution d'extraits ont été introduits dans les puits des plaques de gel. Pour repérer une étendue de masses spécifiques (200, 97, 66, 44, 29, 17, 14, 6 kDa), un standard SC-2361 Broad Range Marker (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a été utilisé (6  $\mu$ L). Un générateur réglé à 150 V a fourni le courant électrique nécessaire à la migration des échantillons pendant 40 min. Après l'expérience, les gels ont été séparés des plaques, rincés à l'eau nanopure pour éliminer la solution tampon, puis révélés à l'aide d'une solution (préalablement chauffée à 50°C) de Coomassie Blue à 0,1% (m/v) dans un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH/acide acétique (5/4/1) pendant 1 h sous agitation orbitale. Par la suite, un rinçage de la plaque à l'eau nanopure a été suivi par trois étapes finales de décoloration (3  $\times$  100 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/EtOH/acide acétique (7/2/1) préalablement chauffée).

### V.1.4. Production de fractions par ultrafiltration

Les étapes d'ultrafiltration des extraits aqueux ont été réalisées à l'aide d'une unité de filtration (Filtration Engineering Co., Inc., MN, USA) équipée de membranes à fibres creuses en polysulfone ROMICON® (Koch Membrane Systems, Wilmington, MA, USA). Dans un premier temps, une membrane d'une surface de 0,46 m<sup>2</sup> et d'un MWCO de 30 kDa a été utilisée pour l'ultrafiltration de AR et AS. Dans chaque cas, le rétentat obtenu (1 L) a constitué la fraction F1 (AR ou AS), tandis que le perméat ( $\approx$  8 L) a subi par la suite une seconde filtration à travers une membrane de 0,70 m<sup>2</sup> et 2 kDa. Le rétentat ainsi obtenu (1 L) est désigné AR F2 ou AS F2 selon l'essence et le perméat ( $\approx$  7 L), F3 (AR ou AS). F3 subit une dernière filtration membranaire consistant en une étape d'osmose inverse à des fins de concentration. La membrane polyamide utilisée, AG-1218 (GE Power & Water, NY, USA) a permis la récupération de F3

concentré en plus ou moins 1 L. La lyophilisation de AR F1, AR F2, AR F3, AS F1, AS F2 et AS F3 par un appareil Virtis Ultra 25 EL Pilot Lyophilizer (SP Scientific, PA, USA) a fourni les fractions sèches.

### **V.1.5. Colorimétrie et analyse élémentaire**

Différents tests ont été mis en œuvre pour caractériser les fractions, dont certains, déjà présentés dans les chapitres précédents ne seront que brièvement rappelés dans cette partie. Pour chaque test, au moins trois répétitions indépendantes ont été effectuées pour permettre une analyse de la variance (ANOVA) et des comparaisons multiples (test du LSD,  $\alpha = 0,05$ ).

#### ***Capacité antioxydante***

Basé sur le protocole utilisé dans les chapitres 1 et 2, la capacité antioxydante des fractions ultrafiltrées a été évaluée par piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>. Utilisant le même spectrophotomètre que précédemment décrit, et les mêmes proportions d'échantillons et de DPPH<sup>•</sup> méthanolique à 40 µg/mL (100 µL + 150 µL), l'expérience a été réalisée en préparant AR F1, F2, F3 à 12 µg/mL et AS F1, F2, F3 à 40 µg/mL (concentrations finales). La courbe de calibration au Trolox a permis l'expression des résultats en équivalents Trolox micromolaires par gramme de fraction sèche (µmol TE/g).

#### ***Phénols totaux***

La teneur en phénols totaux des fractions a été mesurée par la méthode de Folin–Ciocalteu comme détaillé dans les chapitres 1 et 2. De même que les extraits bruts étudiés dans ces chapitres, les échantillons d'AR sont préparés à 80 µg/mL (AR F1, F2, F3) et ceux d'AS à 140 µg/mL (AS F1, F2, F3) en concentrations finales. L'acide gallique est à nouveau utilisé pour produire une courbe de calibration et ainsi, exprimer les résultats en équivalents massiques d'acide gallique (mg GAE/g).

#### ***Proanthocyanidines totales***

Pour estimer les quantités de tannins condensés de type proanthocyanidine dans les fractions, la méthode du butanol acide (Porter *et al.* 1985), également appelée test au butanol–HCl ou test de Porter a été choisie. La manipulation est basée sur l'hydrolyse complète des proanthocyanidines dont les résidus sont par la suite réduits en anthocyanes colorés. L'effet néfaste de l'eau dans cette expérience nous a obligé à limiter sa teneur à 6% dans les échantillons. Pour chacune des fractions AR F1, F2, F3 et AS F1, F2, F3, un aliquot a été préparé, puis soumis à réaction. Comme décrit ci-dessous, il a été nécessaire d'ajouter successivement :

- 80 µL de fraction à 20 mg/mL dans l'eau nanopure
- 920 µL de MeOH
- 6 mL de solution butanol/HCl 12 N (95/5)
- 200 µL de solution à 2% de FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 12 H<sub>2</sub>O dans du HCl 2 N

L'Oligopin®, utilisé comme témoin positif a été soumis aux mêmes conditions à l'exception de la préparation de l'aliquot. Pour conserver la même teneur de 6% d'eau, la solution d'Oligopin® a été préparée dans les 920 µL de MeOH à 200 µg/mL avant ajout de 80 µL d'eau nanopure.

Après agitation des tubes hermétiquement fermés contenant le mélange, ceux-ci ont été plongés dans un bain thermostaté à 95°C et laissés 50 min à l'obscurité. Après 10 min dans la glace pour stopper la réaction et 10 min à température ambiante, l'absorbance des solutions d'essais a été lue à 550 nm par un spectrophotomètre UV-Vis (Varian Cary® 50, Agilent, CA, USA). Le chlorure de cyanidine a permis l'établissement d'une courbe de calibration ( $y = 0,030x$ ,  $r^2 = 0.996$ ) pour exprimer les résultats en équivalents massiques de chlorure de cyanidine (mg CCE/g).

### ***Dosage des protéines***

Un des deux tests présentés dans ce chapitre pour estimer la teneur en protéines des fractions correspond à la méthode de Bradford décrite et référencée dans le chapitre 2. Brièvement, la réaction repose sur le mélange du réactif Coomassie (250 µL) avec chaque fraction (5 µL) dans un puit de microplaque. Après 10 min à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 565 nm. L'albumine de sérum bovin est utilisée comme standard pour établir une courbe de calibration et ainsi traduire les absorbances obtenues en équivalents massiques d'albumine de sérum bovin (mg BSAE/g).

### ***Dosage de l'azote total***

L'autre possibilité revient à évaluer l'azote total des fractions par combustion et analyse élémentaire. Pour cela, un appareil Series II Nitrogen Analyzer 2410 (Perkin Elmer, CT, USA) a été utilisé (Mueller et Liceaga 2016). Pour chaque échantillon (AR et AS F1, 2, 3), 20 mg ont été pesés et soumis à analyse. Pour estimer la teneur en protéines et acides aminés des échantillons, exprimée en pourcentage massique, le facteur de Jones (6,25) a été multiplié à la teneur d'azote total obtenue (Mariotti *et al.* 2008).

## **V.1.6. Analyses chromatographiques et spectroscopiques**

Pour caractériser de manière plus poussée les fractions obtenues en termes de composés phénoliques, et en particulier de tannins, leurs profils ont été observés selon plusieurs techniques analytiques.

### ***HPLC***

Les conditions expérimentales mises en œuvre sont détaillées de manière exhaustive au chapitre 3 (partie III.5.1.). Gardant le même appareillage et les mêmes programmes d'élution pour chaque essence, 10 µL de chaque fraction solubilisée dans l'eau ont été injectés à 2,5 mg/mL (AR) et 5 mg/mL (AS), respectivement. Le profil phénolique d'AS étant peu pertinent d'un point de vue quantitatif, il n'a pas été présenté, dans un souci de cohérence avec les résultats mis en avant en fin de chapitre 3. Nous nous sommes donc concentrés spécifiquement sur l'étude des profils HPLC des fractions de l'érable rouge (AR F1, F2, F3) et de l'influence de l'ultrafiltration sur ceux-ci. Les composés 1–12 sont les mêmes que ceux identifiés au

chapitre 4, à savoir : 3-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexine A (**1**) ; acide gallique (**2**) ; 4-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexine B (**3**) ; 6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnaline B (**4**) ; dérivé digalloyl-glucitol (**5**) ; 2-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnaline C (**6**) ; dérivé digalloyl-glucitol (**7**) ; 3,6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnaline 3,6 (**8**) ; dérivé digalloyl-glucitol (**9**) ; dérivé galloyl glycoside (**10**) ; 2,4-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, maplexine D (**11**) et 2,6-di-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol, ginnaline A (**12**),

### **SEC**

Pour fournir une idée de l'efficacité de l'ultrafiltration pour concentrer des groupes de tannins, les fractions AR et AS, F1, F2, F3, préparées à 2 mg/mL ont été analysées par chromatographie d'exclusion stérique dans des conditions adaptées de Li, W. *et al.* (2015). Un système Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), équipé d'une pompe isocratique, d'un *autosampler*, d'un compartiment à colonne thermostaté (30°C), d'un DAD et du logiciel d'acquisition de données Agilent ChemStation (Agilent Technologies) a été utilisé. La séparation a été effectuée à l'aide de colonnes Agilent PL aquagel-OH 30 et 40 (300 mm × 7,5 mm, 8 µm) et d'une pré-colonne PL aquagel-OH (50 mm × 7,5 mm, 8 µm). Les tannins d'AR et AS ont été observés à 280 nm. Une phase mobile A (eau) a été employée selon un programme isocratique à 0,8 mL/min pendant 40 min.

### **Py-GC-MS**

L'analyse des tannins d'AR et AS par pyrolyse-GC-MS a été effectuée en se concentrant sur les fractions AS F1 et AR F1. Le protocole employé a été basé sur une méthode adaptée par Diouf *et al.* (2013). Chacun des échantillons a été préparé en pesant approximativement une masse de 0,5 mg dans un tube de quartz bouché aux extrémités par de la laine de quartz. Après séchage de l'échantillon placé dans le filament de la sonde pyrolytique d'une interface Pyroprobe 2000 (CDS Analytical Inc., Oxford, PA, USA), celui-ci est pyrolysé dans les conditions suivantes : 250°C pendant 5 s puis 20°C/ms jusqu'à 500°C pendant 4 s. L'échantillon pyrolysé est ensuite analysé en GC-MS par un système de chromatographie gazeuse Varian CP 3800 (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse Varian Saturn 2200 MS/MS (mode impact électronique, 70 eV). L'injection à 250°C avec un split de 1/50 est suivie d'une élution à l'hélium (1 mL/min) à travers une colonne capillaire Varian FactorFour™ VF-5ms (30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm) selon un gradient de 50–300°C à 5°C/min faisant suite à un isocratique d'une minute (50°C).

### **Analyses statistiques**

Tous les dosages colorimétriques et élémentaires ont été réalisés selon trois répétitions et exprimés sous forme de moyennes ± écarts-types. SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) a été utilisé pour l'analyse de variance (ANOVA) suivie de comparaisons multiples par test LSD ( $\alpha = 0.05$ ). Les représentations graphiques ont été produites sur MS Office 2016, Excel et PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) à partir des données brutes des spectres et chromatogrammes.

## V.2. Résultats et discussion

### V.2.1. Saponosides et protéines

Les résultats de test d'hémolyse sont présentés en **Figure V.1**. L'effet des saponosides sur la gélose en termes de lyse des globules rouges est bien représenté par la décoloration observée autour du puit contenant le contrôle positif (Std). On remarque directement que comme pour le contrôle négatif (H<sub>2</sub>O), les puits contenant AR et AS ne sont pas entourés d'une zone de décoloration. Ces résultats, s'ils n'excluent pas totalement la présence de saponosides dans les extraits, montrent qu'une valorisation de tels composés ne semble pas pertinente compte tenu des très faibles quantités dont il serait question.

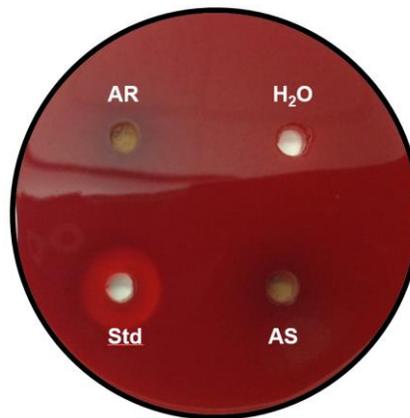


Figure V.1 : Résultats du test d'hémolyse sur gélose d'agar. AR, extrait brut d'écorce d'*Acer rubrum* ; AS, extrait brut d'écorce d'*Acer saccharum* ; H<sub>2</sub>O, témoin négatif ; Std, témoin positif (Saponin).

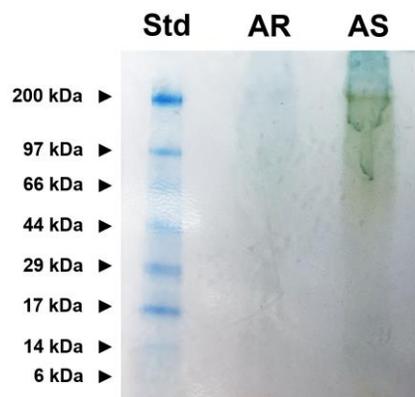


Figure V.2 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des protéines des extraits. AR, extrait brut d'écorce d'*Acer rubrum* ; AS, extrait brut d'écorce d'*Acer saccharum* ; Std, standard SC-2361.

L'analyse par SDS-PAGE des extraits à l'eau chaude a produit des résultats mitigés quant à la présence ou non de groupes de protéines dans ces échantillons (**Figure V.2**). Wetzell *et al.* (1989) ont rapporté un profil des protéines de l'écorce des érables rouge et à sucre. Ils ont mis en évidence des familles de protéines de masses 16 kDa et 24 kDa. Le protocole utilisé a été spécialement mis en œuvre pour extraire et concentrer spécifiquement les protéines. Dans notre cas, l'objectif est plus de vérifier l'occurrence de ces

protéines et surtout si les quantités produites par l'extraction à l'eau chaude pourraient justifier l'ultrafiltration des extraits. La **Figure V.2** montre l'absence des fines bandes bleues caractéristiques des protéines. On peut toutefois remarquer une coloration autour de 200 kDa pour AS qui bien que différente du standard semble démontrer la présence de composés de hautes masses moléculaires.

Au final, les saponosides ne sont pas retenus comme composés d'intérêt pour la suite de l'étude basée sur les expériences d'ultrafiltration. Malgré des résultats très mitigés, des protéines de hautes masses moléculaires, en particulier pour l'érable à sucre pourraient offrir une voie de valorisation pour un extrait soumis à ultrafiltration. La suite du chapitre propose donc une évaluation quantitative des protéines récupérées dans des fractions issues des étapes d'ultrafiltration. Une éventuelle valorisation nécessiterait des caractérisations futures plus poussées *e.g.* par protéomique.

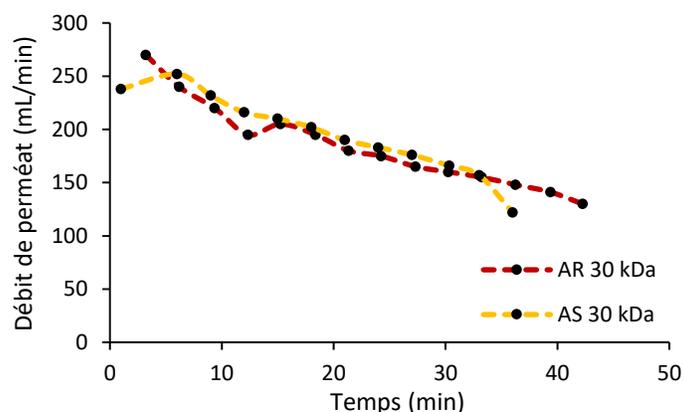


Figure V.3 : Évolution du débit de perméat lors de l'ultrafiltration avec membrane de 30 kDa des extraits d'écorce d'érable (AR, AS).

### V.2.2. Conditions opératoires de l'ultrafiltration

Les expériences d'ultrafiltration ont été effectuées dans des conditions adaptées d'études précédentes (Galanakis 2015b ; Jayarajah et Lee 1999). Pour les quatre expériences (AR membrane 30 kDa, AR membrane 2 kDa, AS membrane 30 kDa, AS membrane 2 kDa), la température d'alimentation a été maintenue à 45°C et la pression transmembranaire à 2,1 bar (30 psi). Le débit de perméat a été mesuré toutes les trois minutes. Fournissant le rétentat : F1 (1 L) et le perméat : F2 (8 L), l'ultrafiltration à 30 kDa a montré une baisse quasi-linéaire du débit de perméat, traduisant un encrassement progressif. Au bout de 40 min, soit la fin de l'expérience, on constate un encrassement (perte de débit) de  $50 \pm 2,2\%$  par rapport au débit initial d'environ 250 mL/min (**Figure V.3**). Ce chiffre assez important devrait pouvoir être amélioré par l'utilisation d'une membrane de surface plus importante que celle utilisée (0,46 m<sup>2</sup>). Pour limiter ce problème une membrane avec un MWCO à 2 kDa et de surface 0,70 m<sup>2</sup> a été choisie pour les expériences d'ultrafiltration des fractions AR F2 et AS F2. Dans ce cas, l'expérience est tellement rapide (5 min) que le débit de perméat initial de 1,1–1,2 L (sensiblement quatre fois plus élevé qu'avec la membrane 30 kDa) ne baisse que de 0,7–2,7%. En cause, la surface de la membrane, mais aussi l'élimination de composés de hautes masses moléculaires, potentiellement responsables de l'encrassement de la membrane 30 kDa par polarisation de concentration (Galanakis 2015a ; McGregor 1986).

Tableau V.1 : Composition chimique et capacité antioxydante des fractions des deux essences d'érable (AR, AS) obtenues par ultrafiltration opérée au laboratoire pilote.

Fractions	Protéines		Tannins	Phénols	Capacité	Fraction / Extrait total % (m/m)
	% <sub>massique</sub> <sup>1</sup>	% <sub>B<sub>SAE</sub></sub> <sup>2</sup>	Condensés (mg CCE/g)	Totaux (mg GAE/g)	Antioxydante ( $\mu$ mol TE/g)	
AR F1	<b>1,83</b> $\pm 0,02$ <b>a</b>	<b>3,18</b> $\pm 0,26$ <b>a</b>	<b>96,2</b> $\pm 3,59$ <b>a</b>	<b>439</b> $\pm 14,0$ <b>b</b>	<b>3822</b> $\pm 258$ <b>b</b>	32,0
AR F2	<b>1,45</b> $\pm 0,06$ <b>b</b>	<b>1,55</b> $\pm 0,10$ <b>b</b>	<b>59,0</b> $\pm 6,07$ <b>b</b>	<b>464</b> $\pm 17,3$ <b>a</b>	<b>5229</b> $\pm 921$ <b>a</b>	12,2
AR F3	<b>1,42</b> $\pm 0,09$ <b>b</b>	<b>1,32</b> $\pm 0,04$ <b>c</b>	<b>50,6</b> $\pm 3,20$ <b>b</b>	<b>473</b> $\pm 20,5$ <b>a</b>	<b>5089</b> $\pm 158$ <b>a</b>	55,8
AS F1	<b>4,26</b> $\pm 0,63$ <b>a</b>	<b>3,40</b> $\pm 0,34$ <b>a</b>	<b>83,9</b> $\pm 7,61$ <b>a</b>	<b>208</b> $\pm 8,7$ <b>a</b>	<b>572</b> $\pm 12,0$ <b>a</b>	39,6
AS F2	<b>1,80</b> $\pm 0,06$ <b>b</b>	<b>0,85</b> $\pm 0,10$ <b>b</b>	<b>23,1</b> $\pm 2,23$ <b>b</b>	<b>114</b> $\pm 6,2$ <b>b</b>	<b>319</b> $\pm 5,0$ <b>b</b>	12,9
AS F3	<b>1,78</b> $\pm 0,01$ <b>b</b>	<b>0,68</b> $\pm 0,07$ <b>b</b>	<b>15,6</b> $\pm 1,85$ <b>c</b>	<b>96</b> $\pm 2,5$ <b>c</b>	<b>250</b> $\pm 8,0$ <b>c</b>	47,5

<sup>1</sup>Résultats d'analyse élémentaire ( $m_{protéines}/m_{fraction}$ ). <sup>2</sup>Résultats du test de Bradford ( $m_{BSAE}/m_{fraction}$ ). BSAE : équivalents albumine de sérum bovin. CCE : équivalents chlorure de cyanidine, GAE : équivalents acide gallique, TE, équivalents Trolox. Résultats exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types. Selon les colonnes, des lettres différentes traduisent une différence significative (test LSD,  $p < 0,05$ ).

### V.2.3. Caractérisation des fractions obtenues

Deux méthodes pour évaluer la teneur en protéines dans les fractions ont été employées : la méthode de l'azote total et la méthode de Bradford. Comme précisé au chapitre 3, la méthode de Bradford dose les protéines de masses moléculaires supérieures à 3 kDa, signifiant que certaines structures plus simples tels que les acides aminés sont potentiellement négligées. Le dosage de l'azote total quant à lui, prend en ligne de compte ces petites structures, mais de nombreuses substances azotées sont également susceptibles d'être dosées *e.g.* acides nucléiques, amines, urée, ammoniac, nitrates, phospholipides, glycosinolates, alkaloïdes (Mariotti *et al.* 2008). Toutefois, devant l'absence quasi-systématique de tels composés dans l'écorce d'*Acer* (Bi *et al.* 2016), il semble prudent de considérer que l'azote ainsi dosé et auquel on a appliqué le facteur de Jones (6,25) représente principalement les acides aminés, peptides et protéines. Le **Tableau V.1** présente, entre autres, les résultats des tests de dosage des protéines réalisés sur les trois fractions de l'extrait aqueux de chaque essence. Il est intéressant de remarquer des comportements similaires des fractions d'une essence à l'autre et ce, pour les deux méthodes de dosage. Les fractions F1 sont significativement plus riches en protéines que les fractions F2 et F3 qui elles ne sont que peu, ou pas différentes d'un point de vue statistique. Pour l'érable à sucre (AS), les valeurs de protéines dosées par l'azote total sont supérieures à celles du Bradford pour F2 et F3 (similaires pour F1 compte tenu des écarts-types élevés), laissant supposer une

proportion non négligeable d'acides aminés et d'oligomères. Dans le cas de l'érable rouge (AR), les valeurs de F2 et F3 sont similaires d'un test à l'autre, mais F1 semble supérieure par méthode de Bradford, indiquant la possible présence de protéines de masses élevées. Au final, si l'ultrafiltration à 30 kDa paraît efficace pour concentrer des protéines de hautes masses moléculaires, la sélectivité de la technique, en particulier en utilisant la membrane à 2 kDa n'est pas optimale. Toutefois, comme évoqué en V.2.1., une exploration plus approfondie basée sur une approche protéomique avec des programmes HPLC dédiés et des colonnes adaptées *e.g.* colonnes à échange d'ions ou HILIC, serait envisageable. Cette approche saurait indiquer les démarches à mettre en œuvre pour optimiser le procédé d'ultrafiltration (MCWO des membranes, nombre d'étapes...).

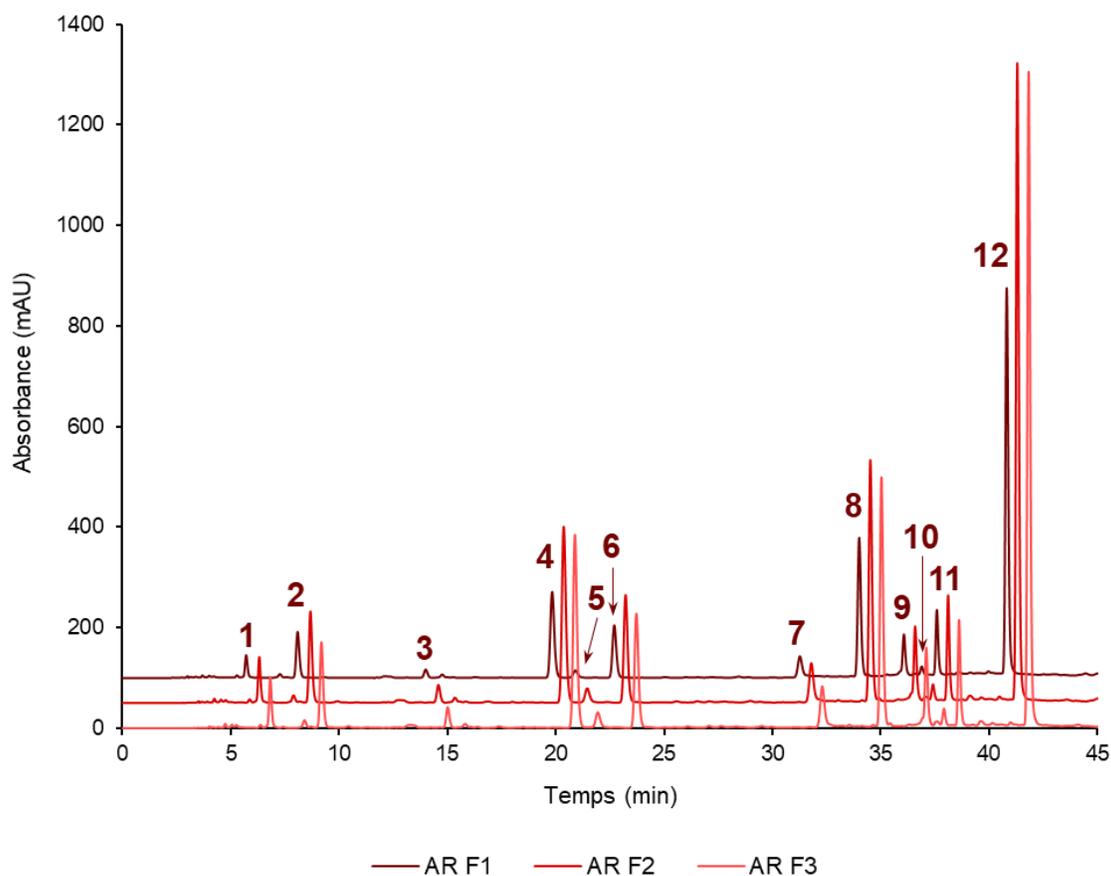


Figure V.4 : Chromatogrammes des fractions de l'extrait aqueux d'écorce d'érable rouge produites par ultrafiltration opérée au laboratoire pilote. Les 12 composés majoritaires du profil à 280 nm, identifiés au chapitre 4 sont représentés (1–12).

Des conclusions similaires peuvent être formulées pour les tannins condensés étant donné le peu d'information disponible sur la nature et les dimensions de tels composés. Si ces considérations seront plus approfondies dans la partie V.2.4., les résultats présentés dans le **Tableau V.1** donnent quelques indices sur les différences entre les tannins des deux érables et l'efficacité de l'ultrafiltration. Tout d'abord, l'expérience du butanol-HCl a été réalisée en lisant les absorbances à 550 nm dans le souci de rester comparable aux résultats de la littérature. Il est toutefois important de signaler que les maxima d'absorbance ont été mesurés

à 548–550 nm pour AS et AR. Cette observation tend à montrer qu’une majorité de résidus cyanidines ( $\lambda_{\max} = 547$  nm) est produite par la réaction par rapport au nombre de delphinidines ( $\lambda_{\max} = 558$  nm). Pour aller plus loin, ceci donne des indices sur la nature des tannins condensés des deux essences, préférentiellement de type proanthocyanidine (Diouf *et al.* 2013). La fiabilité des résultats est appuyée par la valeur de  $764 \pm 34,3$  mg CCE/g obtenue pour l’Oligopin® en accord avec les données des fournisseurs, estimant à plus de 70% par le même test la teneur en proanthocyanidines (DRT 2014). Pour les deux érables, l’ultrafiltration permet de concentrer les tannins condensés dans la fraction F1 (près de 10% en équivalents de cyanidine). Les valeurs peu ou non différentes pour AR F2 et F3, et AS F2 et F3, respectivement, plus faibles, rappellent les résultats en termes de protéines. Pour les fractions d’AS, il est intéressant de remarquer que les valeurs de la teneur en tannins suivent la même distribution comparativement aux valeurs de phénols totaux et de capacité antioxydante (AS F1 : a, AS F2 : b, AS F3 : c). Cette observation est confirmée par les fortes corrélations entre ces variables. La teneur en tanins est corrélée positivement avec la teneur en phénols totaux ( $r = 0,988$  soit  $r^2 = 97,6\%$ ) et la capacité antioxydante ( $r = 0,988$  soit  $r^2 = 97,6\%$ ), ces deux dernières étant corrélées à 98,6% ( $r = 0,993$ ). Ces résultats tendent à montrer l’importance des tannins condensés en termes de composés phénoliques antioxydants au sein de l’érable à sucre. À l’inverse, les tannins condensés de l’érable rouge, bien que plus nombreux, ne se corrèlent pas bien avec les phénols totaux et surtout la capacité antioxydante (**Tableau V.1**). Pour ces deux variables, ce sont les fractions AR F2 et AR F3 qui possèdent les plus hautes valeurs alors que ces fractions ont des teneurs en tannins inférieures à celle de AR F1. Les composés phénoliques antioxydants de faibles masses molaires présentés au chapitre 4 semblent donc responsables des hautes valeurs observées pour AR F2 et AR F3.

Tableau V.2 : Aires des pics d’HPLC correspondant aux 12 composés majoritaires (1–12) du profil à 280 nm des fractions AR F1, AR F2 et AR F3.

Pics	$t_{\text{élution}}^1$ (min)	AUC		
		AR F1	AR F2	AR F3
1	6,8	378	794	885
2	9,2	959	1914	1793
3	15,0	189	402	442
4	20,9	2256	4603	4945
5	21,9	224	420	441
6	23,7	1324	2689	2885
7	32,3	599	1136	1185
8	35,0	2845	4978	5133
9	37,1	819	1491	1556
10	37,9	143	270	285
11	38,6	1055	1718	1731
12	41,8	7223	11973	12365
Totaux :		18013	32388	33646

<sup>1</sup>Temps de rétention des composés. AUC : aire sous la courbe.

Pour s'en assurer, l'influence du fractionnement par ultrafiltration sur les profils HPLC de l'érable rouge a été investiguée. D'après les chromatogrammes des fractions de l'érable rouge (**Figure V.4**), l'étape d'ultrafiltration semble intéressante pour isoler les petites molécules phénoliques (dérivés galloyl-glucitol : composés 1–12) mais on en retrouve tout de même une proportion assez importante dans les fractions F1 et F2. Le **Tableau V.2** traduit ces profils en termes d'aires de pics pour plus de clarté.

Pour conclure cette partie, on peut remarquer que les fractions obtenues par ultrafiltration sont récupérées en quantités similaires d'une essence à l'autre (**Tableau V.1**). F1 et F3 sont logiquement plus conséquentes (32–56% du total récupéré), ayant une étendue en masse moléculaire plus large que F2 (12–13%). En comparant les deux érables, on confirme qu'AR est plus riche en composés galloyl-glucitols antioxydants de faibles masses (AR F3 : 56%), alors qu'AS semble intéressant en termes de tannins de hautes masses (AS F1 : 40%). Finalement, devant la sélectivité négative de la technique d'ultrafiltration (*i.e.* les molécules de hautes masses moléculaires sont retenues mais celles de faibles masses sont récupérées à la fois dans le perméat et dans le rétentat), il pourrait être intéressant de mieux optimiser la méthode. Des cycles de dilution du rétentat/ultrafiltration successifs pourrait être envisagés pour produire une fraction AR F3 concentrant l'essentiel des composés galloyl-glucitol et deux fractions de tannins sous la forme d'AS F1 et d'AR F1. Pour préparer de tels travaux, les types de tannins retenus dans les fractions, en particulier AS F1 et AR F1, ont fait l'objet d'une étude de caractérisation plus poussée à l'aide de techniques analytiques.

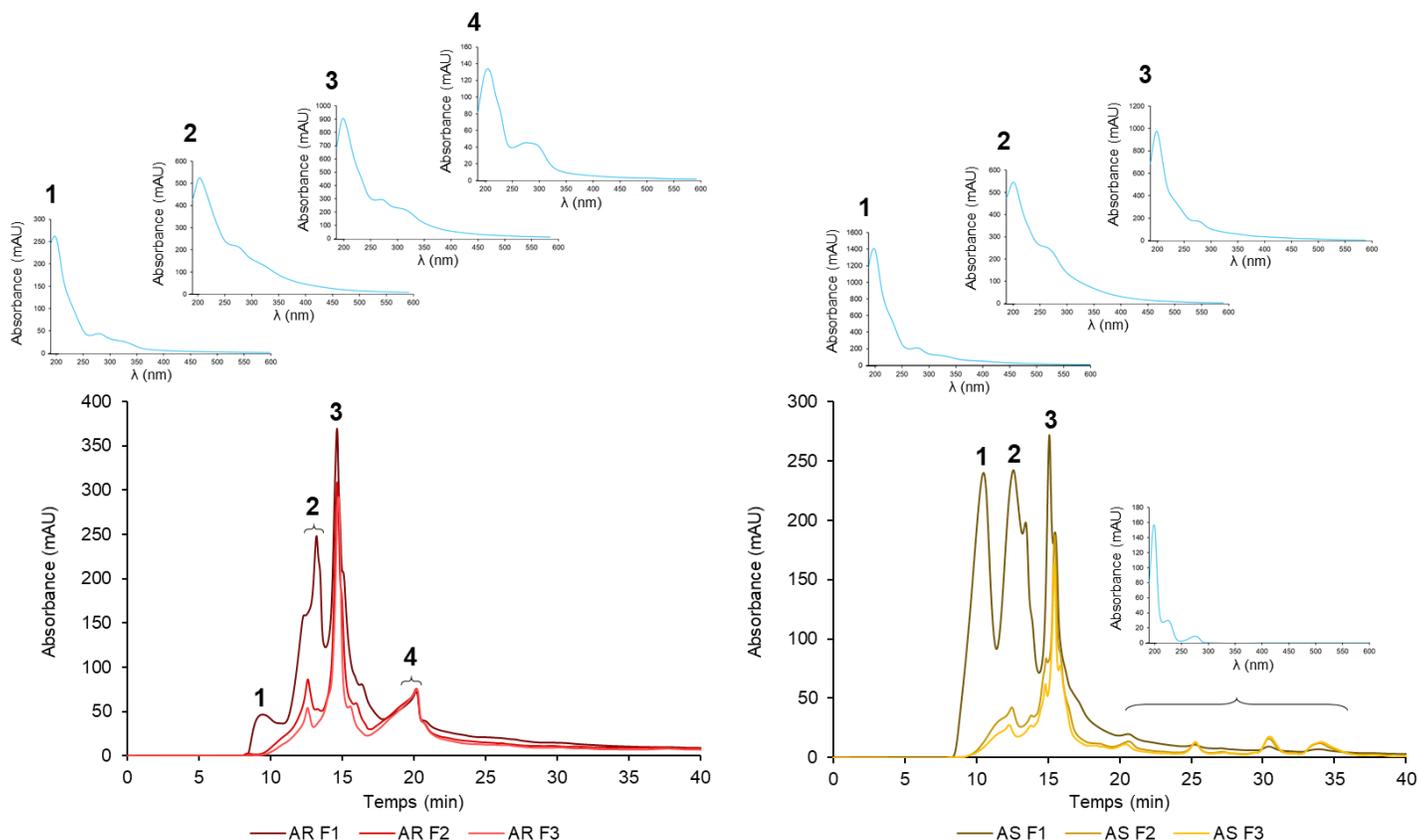


Figure V.5 : Fractions issues d'ultrafiltrations observées en SEC à 280 nm. Spectres UV-Vis associés aux différents pics observés.

## V.2.4. Exploration des tannins

Dans un premier temps, pour fournir un profil des tannins des deux essences, les fractions ultrafiltrées ont été analysées en chromatographie d'exclusion stérique. Il est important de rappeler qu'en SEC (dont le principe est explicité au chapitre 1), les composés sont élués en fonction de leur masse moléculaire, les plus gros sortant en premier. Il a été jugé pertinent d'observer en UV les fractions. En effet, les tannins hydrolysables et condensés s'avèrent détectables à 280 nm (Antoine *et al.* 2004). Les profils chromatographiques des fractions des deux types d'extraits sont présentés en **Figure V.5** : à gauche sont superposées les fractions AR F1, F2, F3, tandis qu'à droite sont figurées AS F1, F2, F3. Dans les deux cas, la fraction F1 permet de mettre en évidence trois groupes ou massifs de pics (figurés 1, 2, 3) élués entre 8–17 min qui semblent communs aux deux érables, eu égard aux temps de rétentions et aux spectres UV obtenus (**Figure V.5**). Qualitativement, la différence entre AR et AS se trouve à partir de 17 min puisqu'AR possède un large pic nommé 4 (18–21 min) et AS plusieurs pics (21 min, 25 min, 31 min, 35 min) d'intensités et d'AUC comparativement plus faibles. Les spectres UV obtenus pour les différents groupes de pics observés montrent un maximum à 200 nm et un plus faible proche de 280 nm (**Figure V.5**). Ceux-ci sont caractéristiques des flavan-3-ols tels que la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine voire de dérivés comme l'épigallocatechine de gallate (Atomsaa et Gholap 2015 ; Bottino *et al.* 2014). Ils pourraient toutefois être également associés à des gallotannins ou ellagitannins de spectres UV du même type (Arapitsas 2012). D'ailleurs des spectres très similaires sont observés pour le vin rouge, riche en proanthocyanidines, gallo- et ellagitannins (Boulet *et al.* 2016).

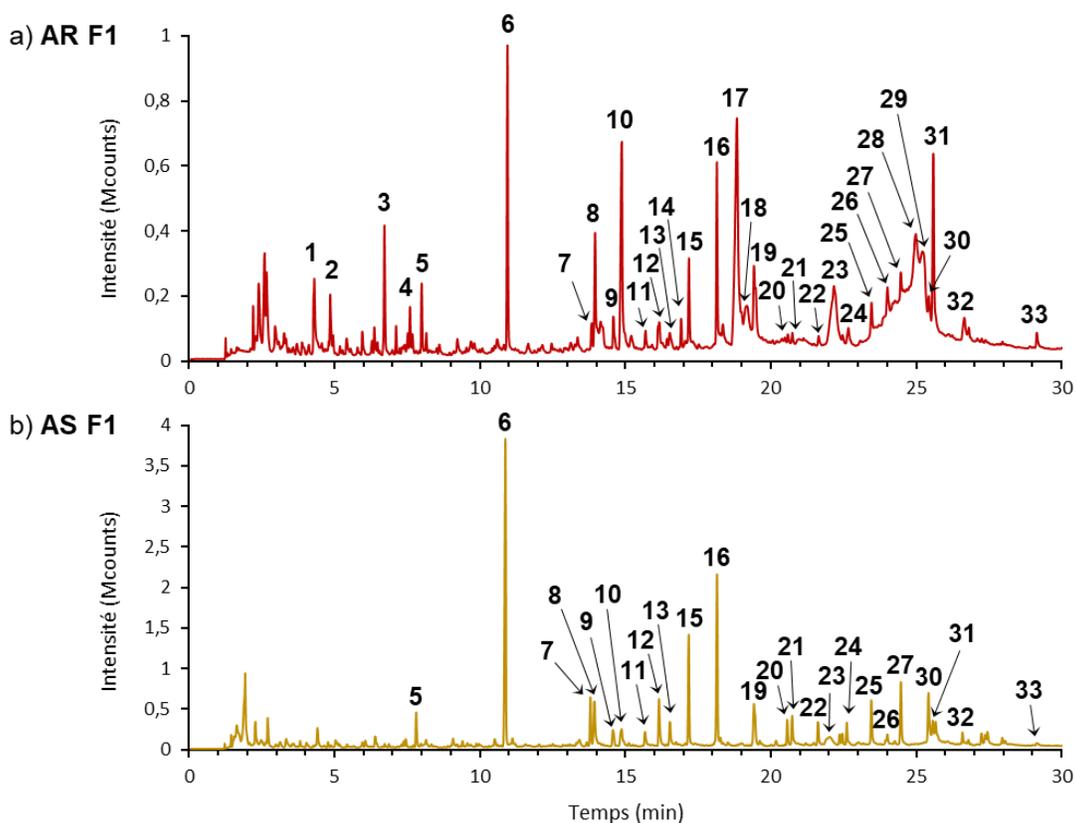


Figure V.6 : Pyrogrammes obtenus après Py-GC-MS des fractions AR F1 et AS F1. Échantillons de masses différentes.

Les fractions ayant été injectées à la même concentration (2 mg/mL), il est possible de discuter les différences observées entre essences (AR, AS) et type de fraction (F1, 2, 3) d'un point de vue semi-quantitatif. Premièrement en termes d'essence, le massif 1 semble plus représenté chez AS que chez AR (**Figure V.5**). La forme du massif 2 diffère entre les deux essences mais son intensité reste constante, contrairement au pic 3, de forme constante mais plus intense pour l'érable rouge. En s'intéressant maintenant aux fractions, on remarque chez les deux essences que les pics 1 et 2 sont largement majoritaires chez F1, le massif 3 étant aussi majoritaire chez F1 mais dans une moindre mesure. Ces résultats illustrent donc bien la concentration de tannins de masses moléculaires élevées dans les fractions AR F1 et AS F1. Comme pour les résultats fournis dans la partie V.2.3., il semble que la différence entre F2 et F3 soit faible remettant en doute la sélectivité de l'étape d'ultrafiltration par membrane polysulfone de 2 kDa. Si pour AR, l'aire du massif 4 semble invariable d'une fraction à l'autre, les pics de AS F2 et F3 correspondant aux composés éluant à partir de 25 min semblent plus intenses, montrant l'intérêt de l'ultrafiltration pour concentrer ces derniers.

Dans le but d'améliorer les connaissances concernant la nature des tannins de masses moléculaires les plus élevées, les fractions AR F1 et AS F1 ont été soumises à une analyse par pyrolyse-GC-MS. Les chromatogrammes correspondants sont présentés en **Figure V.6**. Les pics majoritaires ont été identifiés ou caractérisés par déréplication et sont listés dans le **Tableau V.3**. Dû à la quantité minimale de fractions nécessaire à la préparation des échantillons, les masses pesées peu précisément varient d'un échantillon à l'autre (AR F1 : 0,1–0,4 mg, AS F1 :  $\approx$  0,8 mg). La comparaison quantitative des deux fractions étant par conséquent proscrite, le parti a été pris de se concentrer sur une interprétation semi-quantitative au sein de chaque fraction et une comparaison qualitative des profils des deux essences.

L'intérêt de la Py-GC-MS pour caractériser les tannins condensés repose sur l'habituelle dissociation du cycle B des autres cycles flavaniques A et C par pyrolyse (Galletti *et al.* 1995). Ainsi, l'analyse des résidus de ces noyaux B aromatiques par GC-MS fournit des indices structuraux. Comme illustré par la **Figure V.6** et le **Tableau V.3**, d'un point de vue qualitatif, on constate pour les deux érables la présence de résidus de pyrolyse traduisant la nature proanthocyanidique des tannins condensés. Ceci confirme le constat après hydrolyse acide (butanol-HCl), d'un maximum d'absorption proche de 548 nm caractéristique de la cyanidine, résidu d'hydrolyse commun chez les érables (Bate-Smith 1977). Les résidus pyrolytiques caractéristiques des proanthocyanidines sont le catéchol (8) et le 4-méthylcatéchol (13) traduisant supposément des monomères de type catéchine et épicatechine, respectivement (Guyot 2012). La présence d'un résidu phénol (5) dans le pyrogramme des deux essences pourrait être due à la présence de monomère de type afzéléchine, toutefois de telles structures ne sont pas rapportées dans le genre *Acer*. Une autre hypothèse se base sur le fait que l'intensité du traitement thermique d'un échantillon à pyrolyser influence positivement la quantité de phénol observée (Kaal *et al.* 2012). Ainsi, il paraît envisageable qu'une température de pyrolyse élevée puisse être responsable de la génération de ces résidus à partir de résidus de type catéchol. Toujours chez les deux fractions F1, le guaïacol (6) parmi d'autres phénols étherifiés (7, 11, 12, 15) est observé en quantités appréciables. Les dérivés guaïacol sont généralement associés à l'analyse de la lignine, toutefois il se retrouvent souvent comme résidus de tannins (Diouf *et al.* 2013 ; Galletti *et al.* 1995 ; Kaal *et al.* 2012). Dans notre cas, l'extraction à l'eau chaude semble exclure la présence de lignines dans

les échantillons étant donné le caractère non-hydrosoluble de tels polymères. Les résidus guaiacol issus des tannins sont supposément générés par la fission du noyau C (Galletti *et al.* 1995 ; Kaal *et al.* 2012), ce qui expliquerait leur abondance. L'autre hypothèse serait la présence de tannins constitués de monomères de types méthylcatéchine ou méthylépicatéchine (Diouf *et al.* 2013), cependant ces structures ne sont pas rapportées chez *Acer* et demeurent rares dans la nature (Reddy *et al.* 1995).

Tableau V.3 : Résidus de pyrolyse identifiés et caractérisés par GC-MS par déréplication pour les fractions AR F1 et AS F1 (del Río *et al.* 2005 ; del Río *et al.* 2000 ; Diouf *et al.* 2013 ; Galletti 1991 ; Galletti *et al.* 1995 ; Galletti *et Bocchini* 1995 ; Kaal *et al.* 2012 ; Lv *et Wu* 2012 ; Mészáros *et al.* 2007 ; Nonier *et al.* 2006).

Pics	t <sub>élution</sub> (min)	Fragments (m/z)	Composés proposés	Essences
1	4,3	96, 95, 85, 84, 55	dérivé furanone	AR
2	4,8	96, 95	furfural	AR
3	6,7	110, 109, 81, 53, 43	2-propylfuran	AR
4	7,6	110, 109, 81, 57, 53, 43	5-méthyl-2-furfural	AR
5	8	94, 66, 39	phénol	AR, AS
6	10,9	124, 109	guaiacol	AR, AS
7	13,9	138, 123, 95, 67	<i>p</i> -méthylguaiacol	AR, AS
8	14	110, 63	catéchol	AR, AS
9	14,5	69, 57, 43	2-méthyl-3,5-dihydroxy-4H-pyran-4-one	AR, AS
10	14,8	97, 69, 41	5-(hydroxyméthyl)-2-furfural	AR, AS
11	15,7	140, 125, 97, 51	3-méthoxycatéchol	AR, AS
12	16,1	137, 152	4-éthylguaiacol	AR, AS
13	16,5	124, 78, 51	4-méthylcatéchol	AR, AS
14	16,9	187, 159, 157, 129, 101, 77, 45	dérivé phénolique	AR
15	17,1	150, 135, 107, 77	4-vinylguaiacol	AR, AS
16	18,1	154, 139	syringol	AR, AS
17	18,8	126, 108, 80, 52	pyrogallol	AR
18	19,2	277, 73, 43, 60	dérivé anhydroglucopyranose	AR
19	19,4	140, 125, 97, 69	dérivé phénolique	AR, AS
20	20,6	168, 153, 125	4-méthylsyringol	AR, AS
21	20,7	164, 149	<i>trans</i> -isoeugénol	AR, AS
22	21,6	123, 151, 166	acétovanillone	AR, AS
23	22,2	277, 73, 60, 43	dérivé anhydroglucopyranose	AR, AS
24	22,6	180, 137, 122, 94	guaiacylacétone	AR, AS
25	23,4	180, 165, 137	4-vinylsyringol	AR, AS
26	24	151, 123, 180	propiovanillone	AR, AS
27	24,4	184, 169, 141, 126, 111, 69	3,4,5-triméthoxyphénol	AR, AS
28	25	277, 103, 73, 60, 43	dérivé anhydroglucopyranose	AR
29	25,2	277, 103, 73, 57, 43	dérivé anhydroglucopyranose	AR
30	25,3	182, 137	acide homovanillique	AR, AS
31	25,5	170, 155, 127, 112, 69, 53	inconnu	AR, AS
32	26,6	194, 179, 151, 119, 91	4-propénylsyringol	AR, AS
33	29,1	181, 153	acétosyringol	AR, AS

Concernant les différences entre les deux érables, on peut noter la présence de pyrogallol (17) chez AR F1 mais absent du pyrogramme d'AS F1 (**Figure V.6, Tableau V.3**). Il est possible que ce résidu pyrogallol soit issu de structures de type prodelphinidine. En effet, des indices portant sur la présence de telles structures chez les érables ont été rapportés (Bate-Smith 1977). Toutefois, les maxima d'absorbance observés lors du test de Porter (548–550 nm) laissent supposer que si les prodelphinidines sont présentes, elles le sont en faibles quantités ( $\lambda_{\text{max}} \text{ delphinidine} = 558 \text{ nm}$ ). Une hypothèse plus probable de l'origine du pyrogallol serait la présence de gallotannins chez AR et absents chez AS. Il a été montré que la pyrolyse de tannins hydrolysables tels que l'acide tannique produit principalement du pyrogallol (Xia *et al.* 2015). Dans notre cas, les dérivés galloyl-glucitol observés en HPLC contribuent très certainement à la quantité de pyrogallol généré. Toutefois, des structures plus complexes de gallotannins voire ellagitannins de masses moléculaires plus élevées justifieraient la présence du large pic 4 observé en SEC pour AR. L'hypothèse de la présence de tannins hydrolysables au sein de l'échantillon AR F1 est de plus appuyée par les nombreux résidus de sucres de types furane, furanone et anhydroglucopyranose (1, 2, 3, 4, 18, 28, 29) décrits dans le **Tableau V.3**. La présence de certains résidus (9, 10), également détectables chez AS mais en faibles quantités peut être expliquée par la pyrolyse d'oligosaccharides voire de polysaccharides (Lv et Wu 2012). Il est vrai que de telles structure sont susceptibles d'être contenues dans les échantillons analysés

Au final, des tannins condensés de type proanthocyanidine sont visibles chez les deux types d'érables. Des tannins hydrolysables semblent également présents en quantité mais uniquement chez l'érable rouge.

### V.3. Conclusions et perspectives

Bien que préliminaires, les résultats fournis dans ce chapitre contribuent à renseigner sur les similitudes et différences des extractibles (protéines, tannins, dérivés galloyl-glucitol) de l'écorce des deux essences commerciales étudiées : érable rouge et érable à sucre. Le potentiel de l'ultrafiltration a été évalué révélant une nécessité d'approfondir cette technique pour une séparation optimale des extractibles de masses moléculaires différentes. En particulier, une sélectivité basée principalement sur les dimensions des composés ne semble pas suffisante pour concentrer spécifiquement les dérivés de type galloyl-glucitol. Le choix des membranes, assez génériques pour cette étude, pourrait être amélioré en termes de surface et de polarité pour être plus sélectives et limiter l'encrassement. Le procédé en lui-même, basé sur une sélection négative pourrait également bénéficier d'étapes supplémentaires pour une meilleure répartition des composés selon leur masse, tout en contrôlant l'encrassement associé. En définitive, malgré une faisabilité intéressante à grande échelle, l'ultrafiltration des extraits d'écorce d'érable requiert des investigations supplémentaires des protéines, tannins condensés et tannins hydrolysables avant d'envisager de réelles applications commerciales.

## Conclusion générale

Le projet de doctorat présenté ici traite de l'étude des extractibles, en particulier phénoliques, et d'un procédé permettant leur production (extraction et traitements de conditionnement). Il propose ainsi des bases nécessaires pour envisager un développement à plus grande échelle. Les résultats présentés dans les différents chapitres de la thèse ont permis de mettre en évidence des points clés en faveur d'une valorisation de l'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre. Ces éléments essentiels tirés des quatre volets répondant aux quatre objectifs de la thèse (c.f. partie I.4.) sont rappelés et synthétisés.

Pour répondre au premier objectif, les extraits à l'eau chaude de l'écorce des deux érables ont été comparés pour la première fois et la supériorité de l'érable rouge a été démontrée que ce soit en termes de rendements d'extraction, de teneur en composés phénoliques ou de capacité antioxydante. Une étude statistique à l'aide, entre autres, d'analyses multivariées a permis de cibler des conditions d'extraction optimales pour les deux essences, regroupées en trois grandes catégories : des plus énergivores/à haut rendement/fournissant une faible qualité, aux plus économiques/de rendement inférieurs/de qualité maximale et passant par des conditions intermédiaires à ces deux catégories. Finalement pour permettre la faisabilité du procédé d'extraction au laboratoire pilote, les conditions de granulométrie, température, ratio écorce/solvant et de durée suivantes ont été jugées pertinentes : 250–500  $\mu\text{m}$ , 90°C, 1/10 (m/m), 1 h.

Ces conditions ont donc constitué la base du deuxième volet qui traitait de l'optimisation en laboratoire pilote du procédé de production d'extraits d'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre. L'objectif était d'élargir l'étude des composés phénoliques à d'autres extractibles d'intérêt (protéines, glucides), pour fournir une évaluation préliminaire du potentiel des extraits comme additifs alimentaires. La quantité limitée dans la littérature de travaux similaires portant sur des procédés complets et optimisés de production d'extraits bioactifs traduit l'originalité de la démarche. La comparaison de techniques de concentration et de séchage des extraits par analyses multivariées a conduit à choisir un procédé couplant la concentration par osmose inverse à un séchage, soit par atomisation pour maximiser la productivité et l'économie d'énergie, soit par lyophilisation pour assurer une qualité et une récupération d'extrait maximales. En plus des divergences des deux extraits d'érable en termes de teneur en composés phénoliques et de capacité antioxydante, mises en évidence dans le premier objectif, les résultats du deuxième objectif ont montré deux compositions chimiques bien différentes. Si l'extrait d'érable rouge semble rester plus attractif du point de vue phénolique/antioxydant, celui d'érable à sucre montre une haute teneur en glucides, fournissant deux potentiels différents pour une valorisation en tant qu'additifs alimentaires.

Devant les résultats notables d'activité antioxydante de l'extrait d'érable rouge fournis dans les deux premières parties (supposément due aux composés phénoliques), un criblage antioxydant a été effectué pour répondre au troisième objectif. Les composés majoritaires de l'extrait ont été identifiés par déréplication à l'aide de données chromatographiques et spectrales (LC–MS, UV). Leur comportement antioxydant a été évalué sous différentes formes : au sein de l'extrait, dans des mixtures ou mélanges tertiaires, et individuellement, par des techniques couplant HPLC et test au radical DPPH• (DPPH *spiking*, DPPH–

HPLC/AE). Les résultats ont montré pour la première fois l'inaptitude de ces méthodes à évaluer précisément l'efficacité antioxydante des dérivés galloyl-glucitol de l'érable rouge, remettant en question leur pertinence pour d'autres composés. En revanche, les méthodes investiguées ont permis de mettre en évidence un phénomène d'auto-oxydation des composés purs, non observé lorsque ceux-ci ont été évalués dans les mixtures ou dans l'extrait brut. Ces constatations traduisent l'existence d'un effet de matrice/mixture influant sur l'activité antioxydante des dérivés galloyl-glucitols. Cet effet s'est avéré être additif dans le cas du mélange des trois composés sélectionnés : acide gallique, ginnaline C, ginnaline A. Au final, de tels résultats témoignent de la pertinence d'utiliser un extrait brut en tant que produit voire de produire des fractions de composés par rapport à une stratégie basée sur leur isolement.

Ainsi dans le dernier objectif, la faisabilité de la production de fractions des extraits d'écorce d'érable rouge et d'érable à sucre a été investiguée à travers une approche originale basée sur l'ultrafiltration à l'échelle laboratoire pilote. Cette technique de filtration membranaire a permis une concentration assez sélective des dérivés galloyl-glucitol pour l'érable rouge, qui bien que perfectible, a démontré un réel potentiel. Ce volet a également été l'occasion d'utiliser l'ultrafiltration pour séparer puis caractériser les tannins condensés et hydrolysables des deux essences, dont les structures et quantités au sein de l'écorce n'ont été à notre connaissance que peu, voire pas du tout étudiées. Les techniques colorimétriques, chromatographiques et spectroscopiques utilisées ont montré que des tannins condensés de type proanthocyanidine sont présents chez les deux types d'érables à une teneur de 8–10% dans la fraction riche en composés de plus hautes masses moléculaires. D'autre part, des indices ont été mis en lumière quant à la présence chez l'érable rouge de tannins hydrolysables, de masses supérieures aux composés de type galloyl-glucitol.

Au final, les travaux réalisés dans le troisième volet ouvrent la voie à de possibles investigations concernant les effets de mélange et de matrice sur la bioactivité des extractibles. Assez fondamentale, cette approche centrée sur le développement de méthode nécessiterait de s'intéresser à d'autres produits naturels que ceux étudiés et de se baser préférentiellement sur des tests biologiques *in vitro* voire *in vivo* pour une portée accrue. Pour une continuation plus appliquée des travaux, si les deux premiers objectifs basés sur de l'optimisation de procédé confirment bien l'hypothèse de recherche, ils pourraient bénéficier d'études complémentaires. Des tests de toxicité *in vivo*, une analyse de cycle de vie, une étude de faisabilité à plus grande échelle, voire également une étude de marché seraient nécessaires pour garantir la rentabilité de la production d'extraits d'érables en tant qu'additifs alimentaires. Le fractionnement par ultrafiltration, présenté dans la dernière partie des travaux comme un outil de concentration de différents types de composés extractibles (protéines, tannins, dérivés acides-phénols, glucides) a montré un réel potentiel pour un développement à plus grande échelle mais nécessiterait une exploration plus étendue. De plus, malgré les informations fournies sur ces composés, des investigations supplémentaires concernant leurs structures, activités, et non-toxicité potentielles semblent requises avant d'envisager des applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques futures.

## Bibliographie

- Abeywickrama G, Debnath SC, Ambigaipalan P, et al. (2016) Phenolics of Selected Cranberry Genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and Their Antioxidant Efficacy. *J. Agric. Food Chem.* 64(49), 9342-9351. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04291>
- Abou-Zaid MM, Helson BV, Nozzolillo C, et al. (2001) Ethyl m-digallate from red maple, *Acer rubrum* L., as the major resistance factor to forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* Hbn. *J. Chem. Ecol.* 27(12), 2517–2527.
- Alemdag IS (1981) *Equations de masse pour la portion épigée de six essences de feuillus dans des peuplements naturels de la forêt expérimentale de Petawawa* (17 p.). Chalk River : Institut forestier national de Petawawa. Service canadien des forêts.
- Almutairi MS et Ali M (2015) Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR. *Nat. Prod. Res.* 29(13), 1271-1275. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.992345>
- Andary C, Mondolot-Cosson L et Dai GH (1996) In Situ Detection of Polyphenols in Plant Microorganism Interactions. Dans Nicole, M et Gianinazzi-Pearson, V (dir.), *Histol. Ultrastruct. Mol. Cytol. Plant-Microorg. Interact.* pp. 43-53. Dordrecht : Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0189-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0189-6_3)
- Antoine M-L, Simon C et Pizzi A (2004) UV spectrophotometric method for polyphenolic tannin analysis. *J. Appl. Polym. Sci.* 91(4), 2729–2732.
- Arapitsas P (2012) Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem.* 135(3), 1708-1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
- Arzate A (2008) *Procédés de séparation membranaire et leur application dans l'industrie alimentaire* (56 p.). St Norbert d'Arthabaska : Centre de recherche de développement et de transfert technologique en agriculture (ACER).
- Atomsaa T et Gholap V (2015) Characterization and determination of catechins of green tea leaves using UV-visible spectrometer. *J. Eng. Technol. Res.* 7(1), 22-31.
- Bajpai P (2015) Generation of waste in pulp and paper mills. Dans *Manag. Pulp Pap. Mill Waste.* pp. 9-17. New York : Springer.
- Baker RW (2012) *Membrane technology and applications*. 3rd ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken : John Wiley & Sons. 575 p.
- Başkan KS, Tütem E, Akyüz E, et al. (2016) Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta* 147, 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.049>
- Bate-Smith EC (1977) Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry* 16, 1421-1426.
- Batsy DR, Solvason CC, Sammons NE, et al. (2012) Product portfolio selection and process design for the forest biorefinery. Dans *Integr. Biorefineries Des. Anal. Optim.* pp. 3-35. Boca Raton : CRC Press.
- Bazinet L, Cossec C, Gaudreau H, et al. (2009) Production of a Phenolic Antioxidant Enriched Cranberry Juice by Electrodialysis with Filtration Membrane. *J. Agric. Food Chem.* 57(21), 10245-10251. <https://doi.org/10.1021/jf9021114>

- Bell DS (2013) *HILIC chromatography: Theory and method development practices*. Supelco/Sigma-Aldrich. Récupéré de [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General Information/1/HILIC-sep\\_sci\\_webinar\\_09132013.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General Information/1/HILIC-sep_sci_webinar_09132013.pdf)
- Bernardes AM (2014) General Aspects of Membrane Separation Processes. Dans Bernardes, AM, Rodrigues, MAS, et Zoppas Ferreira, J (dir.), *Electrodialysis Water Reuse*. pp. 3-9. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-40249-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-40249-4_2)
- Bhatta S, Ratti C, Poubelle PE, et al. (2018) Nutrients, Antioxidant Capacity and Safety of Hot Water Extract from Sugar Maple (*Acer saccharum* M.) and Red Maple (*Acer rubrum* L.) Bark. *Plant Foods Hum. Nutr.* 73(1), 25-33. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0656-3>
- Bi W, Gao Y, Shen J, et al. (2016) Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Acer* (maple): A review. *J. Ethnopharmacol.* 189, 31-60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.021>
- Bimkr M, Rahman RA, Ganjloo A, et al. (2012) Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. *Food Bioprocess Technol.* 5(3), 912-920. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0504-4>
- Boeing JS, Barizão ÉO, Silva BC, et al. (2014) Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent. J.* 8(1), 48.
- Bollag DM, Rozycki MD et Edelstein SJ (1996) *Protein Methods*. 2nd éd. Hoboken : Wiley Publishers. 432 p.
- Bottino DA, Nogueira DCG et Bouskela E (2014) Low dose of green tea catechins improves endothelial function and vascular smooth muscle cell reactivity in obese women. *Med. Express* 1(5), 262-267. <https://doi.org/10.5935/MedicalExpress.2014.05.09>
- Bouarab-Chibane L, Ouled-Bouhedda B, Leonard L, et al. (2017) Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging. *Eur. Food Res. Technol.* 243(11), 1997-2009. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2905-3>
- Boulet J-C, Trarieux C, Souquet J-M, et al. (2016) Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chem.* 190, 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.062>
- Boussetta N, Vorobiev E, Deloison V, et al. (2011) Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chem.* 128(2), 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2), 248-254.
- Browne T, Jemaa N, Karidio I, et al. (2012) Forest Biorefinery. Dans *Integr. Biorefineries Des. Anal. Optim.* pp. 491-516. Boca Raton : CRC Press.
- Bruneton J (2009) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 4e éd. Cachan : Lavoisier. 1269 p.
- Brütsch L, Huggler I, Kuster S, et al. (2017) Industrial Roller Milling Process Characterisation for Targeted Bread Quality Optimization. *Food Bioprocess Technol.* 10(4), 710-719. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1856-1>

- Buszewski B et Noga S (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402(1), 231-247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Carvalho LMJ de, Silva CAB da et Pierucci APTR (1998) Clarification of pineapple juice (*Ananas comosus* L. Merrill) by ultrafiltration and microfiltration: physicochemical evaluation of clarified juices, soft drink formulation, and sensorial evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 46(6), 2185–2189.
- Castro-Montoya AJ et Jiménez-Gutiérrez A (2012) Lignocellulosic Biomass: A Raw Material for the Future. Dans *Integr. Biorefineries Des. Anal. Optim.* pp. 461-468. Boca Raton : CRC Press.
- Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S, et al. (2006) Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40(2), 460-464. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.042>
- Chemat F, Vian MA et Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13(12), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen H (2014) Chemical composition and structure of natural lignocellulose. Dans *Biotechnol. Lignocellul.* pp. 25–71. New-York : Springer.
- Chen T et Wong Y-S (2008) *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *J. Agric. Food Chem.* 56(12), 4352-4358. <https://doi.org/10.1021/jf073399k>
- Cheyran M (1998) *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Boca Raton : CRC press. 552 p.
- CIFQ (2013) *Statistiques de l'industrie forestière du Québec* (10 p.). Québec : Conseil de l'Industrie Forestière du Québec.
- Cissé M, Vaillant F, Bouquet S, et al. (2011) Athermal concentration by osmotic evaporation of roselle extract, apple and grape juices and impact on quality. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12(3), 352-360. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.02.009>
- Cloutier A, Achim A et Pothier D (2010) Notes de cours. SBO-7020 : Anatomie et structure du bois. Faculté de foresterie, de géographie et de géomatique. Université Laval.
- Co M (2010) *Pressurised fluid extraction of bioactive species in tree barks* (Thèse de doctorat). Uppsala Universitet, Uppsala, SE.
- Combo AMM, Aguedo M et Paquot M (2011) Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 15(1), 153-164.
- Condassamy O (2015) *Valorisation d'une lignine alcaline industrielle : vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine*. <NNT : 015BORD0265>. <tel-01256622> (Thèse de doctorat). Université de Bordeaux, Bordeaux, FR.
- Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, et al. (2012) Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11(2), 148-173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>
- Croteau R, Kutchan TM et Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). Dans *Biochem. Mol. Biol. Plants*, 24. pp. 1250–1319. Rockville : B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones.
- Crozier A, Clifford MN et Ashihara H (2006) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford, UK : Blackwell Pub Ltd. 372 p.

- Cuevas Valenzuela J, Vergara-Salinas JR et Pérez-Correa JR (dir.) (2017) *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols*. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group. 335 p.
- Cui S et Brummer Y (2005) Understanding Carbohydrate Analysis. Dans Cui, S (dir.), *Food Carbohydr.* pp. 67-104. Boca Raton : CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203485286.ch2>
- Dang L et Van Damme EJM (2015) Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 117, 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- Daufin G, René F et Aïmar P (1998) *Séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. [s.l.] : Lavoisier Tec & Doc.
- del Río JC, Gutiérrez A, Hernando M, et al. (2005) Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 74(1-2), 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2004.10.010>
- del Río JC, Romero J et Gutierrez A (2000) Analysis of pitch deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *J. Chromatogr. A* 874(2), 235–245.
- Dev SRS et Raghavan VGS (2012) Advancements in Drying Techniques for Food, Fiber, and Fuel. *Dry. Technol.* 30(11-12), 1147-1159. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.692747>
- Dewick PM (2002) *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3rd éd. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc. 550 p.
- Diouf PN, Tibirna CM, García-Pérez M-E, et al. (2013) Structural Elucidation of Condensed Tannin from *Picea mariana* Bark. *J. Biomater. Nanobiotechnology* 4(3), 1-8. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.43A001>
- Dorta E, Lobo MG et González M (2012) Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 45(2), 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.016>
- Dorta E, Lobo MG et González M (2013) Optimization of Factors Affecting Extraction of Antioxidants from Mango Seed. *Food Bioprocess Technol.* 6(4), 1067-1081. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0750-0>
- DRT (2014) *French Maritime Pine Bark Extract, Oligopin® PUR'expert* (2 p.). Dax : Purextract.
- Ekman A, Campos M, Lindahl S, et al. (2013) Bioresource utilisation by sustainable technologies in new value-added biorefinery concepts – two case studies from food and forest industry. *J. Clean. Prod.* 57, 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.003>
- El Darra N, Grimi N, Vorobiev E, et al. (2013) Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food Bioprocess Technol.* 6(5), 1281-1289. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0869-7>
- El-Abbassi A, Kiai H, Raiti J, et al. (2014) Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment. *J. Clean. Prod.* 65, 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.08.016>
- Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, et al. (2013) Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 6(3), 628-647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Feng S, Cheng S, Yuan Z, et al. (2013) Valorization of bark for chemicals and materials: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 26, 560-578. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.024>

- Ferreira ICFR, Heleno SA, Reis FS, et al. (2015) Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry* 114, 38-55. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.011>
- Foti MC (2007) Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* 59(12), 1673-1685. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0010>
- Foti MC (2015) Use and Abuse of the DPPH · Radical. *J. Agric. Food Chem.* 63(40), 8765-8776. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>
- Foti MC, Daquino C et Geraci C (2004) Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH · Radical in Alcoholic Solutions. *J. Org. Chem.* 69(7), 2309-2314. <https://doi.org/10.1021/jo035758q>
- Francezon N et Stevanovic T (2017a) Chemical composition of essential oil and hydrosol from *Picea mariana* bark residue. *BioResources* 12(2), 2635-2645.
- Francezon N et Stevanovic T (2017b) Integrated process for the production of natural extracts from black spruce bark. *Ind. Crops Prod.* 108, 348-354. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.052>
- Friaa O et Brault D (2006) Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH· in semi-aqueous solution.pdf. *Org. Biomol. Chem.* 4, 2417-2423. <https://doi.org/10.1039/b602147f>
- Friesen JB, McAlpine JB, Chen S-N, et al. (2015) Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *J. Nat. Prod.* 78(7), 1765-1796. <https://doi.org/10.1021/np501065h>
- Galanakis CM (2015a) *Food waste recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Cambridge : Academic Press. 412 p.
- Galanakis CM (2015b) Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. *Trends Food Sci. Technol.* 42(1), 44-63. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.005>
- Galanakis CM, Markouli E et Gekas V (2013) Recovery and fractionation of different phenolic classes from winery sludge using ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.* 107, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.034>
- Galletti GC (1991) Py-GC-ion trap detection of sorghum grain polyphenols (vegetable tannins): preliminary results. *Am. Chem. Soc.-Div. Fuel Chem.* 36, 691-702.
- Galletti GC et Bocchini P (1995) Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry of lignocellulose. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9(9), 815-826.
- Galletti GC, Modafferi V, Poiana M, et al. (1995) Analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis-methylation of wine tannin. *J. Agric. Food Chem.* 43(7), 1859-1863.
- García-Pérez M-E, Royer M, Duque-Fernandez A, et al. (2010) Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.* 132(1), 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.030>
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2006) *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography: Principles and methods*. Uppsala : GE Healthcare. 168 p.
- Geoffroy TR, Fortin Y et Stevanovic T (2017a) Hot-water extraction optimization of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark applying principal component analysis. *J. Wood Chem. Technol.* 37(4), 261-272. <https://doi.org/10.1080/02773813.2017.1279631>

- Geoffroy TR, Fortin Y et Stevanovic T (2017b) Process optimisation for pilot-scale production of maple bark extracts, natural sources of antioxidants, phenolics and carbohydrates. *Chem. Pap.* <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0355-9>
- Geoffroy TR, Meda NR et Stevanovic T (2017c) Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloyl derivatives from red maple bark extract. *Anal. Bioanal. Chem.* 409(22), 5228-5237. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0465-9>
- Georgetti SR, Casagrande R, Souza CRF, et al. (2008) Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 41(8), 1521-1527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.001>
- Gignac M (1992) *Évaluation du pouvoir fongicide ou fongistatique des extraits d'écorce d'épinette blanche (Picea glauca) pour la production des bois verts* (Mémoire de maîtrise). Université Laval, Québec, CA.
- Glish GL et Vachet RW (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2(2), 140-150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>
- González-Sarrías A, Li L et Seeram NP (2012a) Effects of maple (*Acer*) plant part extracts on proliferation, apoptosis and cell cycle arrest of human tumorigenic and non-tumorigenic colon cells. *Phytother. Res.* 26(7), 995-1002. <https://doi.org/10.1002/ptr.3677>
- González-Sarrías A, Ma H, Edmonds ME, et al. (2013) Maple polyphenols, ginnalins A–C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chem.* 136(2), 636-642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.023>
- González-Sarrías A, Yuan T et Seeram NP (2012b) Cytotoxicity and structure activity relationship studies of maplexins A–I, gallotannins from red maple (*Acer rubrum*). *Food Chem. Toxicol.* 50(5), 1369-1376. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.031>
- Guillarme D et Veuthey J-L (2012) *UHPLC in Life Sciences*. Londres : Royal Society of Chemistry. FP001 p. <https://doi.org/10.1039/9781849735490>
- Guyot S (2012) Flavan-3-ols and proanthocyanidins. Dans *Handb. Anal. Act. Compd. Funct. Foods*. pp. 317-348. Boca Raton : CRC Press.
- Hagerman AE (2002) *Tannin Handbook*. Oxford : Miami University.
- Harkin JM et Rowe JW (1971) *Bark and its possible uses*, 91. Madison, WI : Forest Products Laboratory, Forest Service, U.S. Dept. of Agriculture. 60 p.
- Harvey D (2000) *Modern analytical chemistry*. Boston : McGraw-Hill. 798 p.
- Hatano T, Hattori S, Ikeda Y, et al. (1990) Gallotannins having 1,5-anhydro-D-glucitol core and some ellagitannins from *Acer* species. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38, 1902–1905.
- He C, Long Y, Pan J, et al. (2007) Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70(2), 133-150. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.07.005>
- Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, et al. (2012) *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2nd éd. Londres : Churchill Livingstone. 336 p.
- Huang Z et Yan N (2014) Characterization of major components in barks from five Canadian tree species. *Wood Fiber Sci.* 46(2), 167-174.

- Ingold KU et Pratt DA (2014) Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry in the 21st Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective. *Chem. Rev.* 114(18), 9022-9046. <https://doi.org/10.1021/cr500226n>
- Ishii T (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127(2), 111–127.
- Ishwarya SP, Anandharamakrishnan C et Stapley AGF (2015) Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends Food Sci. Technol.* 41(2), 161-181. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.008>
- Islam N, Li G, Garrett WM, et al. (2015) Proteomics of Nitrogen Remobilization in Poplar Bark. *J. Proteome Res.* 14(2), 1112-1126. <https://doi.org/10.1021/pr501090p>
- Jacotet-Navarro M, Rombaut N, Fabiano-Tixier A-S, et al. (2015) Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnolic and ursolic acids from rosemary. *Ultrason. Sonochem.* 27, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.006>
- Jayarajah CN et Lee CM (1999) Ultrafiltration/reverse osmosis concentration of lobster extract. *J. Food Sci.* 64(1), 93–98.
- Jensen W, Fremer KE, Sierila P, et al. (1963) The chemistry of bark. Dans *Chem. Wood.* New York : Wiley-Interscience.
- Jessome AP (1977) *Résistance et propriétés connexes des bois indigènes au Canada* (3 p.). Ottawa : Forintek Canada Corporation. Laboratoire des produits forestiers de l'Est.
- Kaal J, Nierop KGJ, Kraal P, et al. (2012) A first step towards identification of tannin-derived black carbon: Conventional pyrolysis (Py–GC–MS) and thermally assisted hydrolysis and methylation (THM–GC–MS) of charred condensed tannins. *Org. Geochem.* 47, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2012.03.009>
- Khanbabaee K et van Ree T (2001) Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18(6), 641–649.
- Khemani LD, Srivastava MM et Srivastava S (dir.) (2012) *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives.* Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23394-4>
- Kim JS, Jeong MH et Lee HY (2014) Optimization of extraction process for enhancement of antioxidant activity of *Acer mono* bark. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 87, 46-55.
- Koops GH (2010) Preparation and characterization of micro- and ultrafiltration membranes. Dans *Encycl. Desalination Water Resour. Membr. Process.*, 2. pp. 61. Oxford : EOLSS Publishers.
- Krochmal A, Walters RS et Doughty RM (1969) *A guide to medicinal plants of Appalachia*, 138. Upper Darby, PA : Northeastern Forest Experiment Station, Forest Service, U.S. Dept. of Agriculture. 291 p.
- Kuck LS et Noreña CPZ (2016) Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chem.* 194, 569-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>
- Layne E (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3(73), 447-454.
- Le Normand M, Edlund U, Holmbom B, et al. (2012) Hot-water extraction and characterization of spruce bark non-cellulosic polysaccharides. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 27(1), 18-23.

- Le Normand M, Mérida H, Holmbom B, et al. (2014) Hot-water extracts from the inner bark of Norway spruce with immunomodulating activities. *Carbohydr. Polym.* 101, 699-704. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.067>
- Lester GE, Lewers KS, Medina MB, et al. (2012) Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J. Food Compos. Anal.* 27(1), 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.003>
- Li L, Henry GE et Seeram NP (2009) Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57(16), 7282-7287. <https://doi.org/10.1021/jf901716j>
- Li L et Seeram NP (2010) Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 58(22), 11673-11679. <https://doi.org/10.1021/jf1033398>
- Li L et Seeram NP (2011) Quebecol, a novel phenolic compound isolated from Canadian maple syrup. *J. Funct. Foods* 3(2), 125-128. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.004>
- Li W, Zhang J, Yu C, et al. (2015) Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohydr. Polym.* 121, 315-319. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.055>
- Li X (2017) 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-Oxide (PTIO<sup>•</sup>) Radical Scavenging: A New and Simple Antioxidant Assay *In Vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 65(30), 6288-6297. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02247>
- Liu RH (2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78(3), 517S–520S.
- Luthria DL (2012) Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. *J. Funct. Foods* 4(4), 842-850. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.001>
- Lv G et Wu S (2012) Analytical pyrolysis studies of corn stalk and its three main components by TG-MS and Py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 97, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.04.010>
- Ma H, Liu W, Frost L, et al. (2016) Glucitol-core containing gallotannins inhibit the formation of advanced glycation end-products mediated by their antioxidant potential. *Food Funct* 7(5), 2213-2222. <https://doi.org/10.1039/C6FO00169F>
- Ma H, Xu J, DaSilva NA, et al. (2017) Cosmetic applications of glucitol-core containing gallotannins from a proprietary phenolic-enriched red maple (*Acer rubrum*) leaves extract: inhibition of melanogenesis via down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expression in B16F10 melanoma cells. *Arch. Dermatol. Res.* 309(4), 265-274. <https://doi.org/10.1007/s00403-017-1728-1>
- maple-trees.com (2000) Maple tree identification. Récupéré de <http://www.maple-trees.com/pages/maple-tree-identification.php>
- Maqsood S et Benjakul S (2013) Effect of Kiam (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) Wood Extract on the Haemoglobin-Mediated Lipid Oxidation of Washed Asian Sea Bass Mince. *Food Bioprocess Technol.* 6(1), 61-72. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0530-x>
- Maqsood S, Benjakul S et Balange AK (2012) Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. *Food Chem.* 130(2), 408-416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.065>

- Margraf T, Karnopp AR, Rosso ND, et al. (2015) Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates: Prussian Blue assay for total phenols. *J. Food Sci.* 80(11), 2397-2403. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>
- Mariotti F, Tomé D et Mirand PP (2008) Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48(2), 177-184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Martín Á, Rodríguez-Rojo S, Navarrete A, et al. (2013) Post-extraction Processes: Improvement of Functional Characteristics of Extracts. Dans Rostagno, MA et Prado, JM (dir.), *Nat. Prod. Extr.* pp. 285-313. Cambridge : Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00285>
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* 339(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- McGregor WC (1986) *Membrane separations in biotechnology, 1*. New-York : Marcel Dekker. Inc. 408 p.
- McSweeney GP (1965) Two methods for the thin-layer chromatographic separation of terpene alcohols and identification by a colour reaction. *J. Chromatogr. A* 17, 183–185.
- Meda NR (2018) *Potentiel de valorisation d'extraits bioactifs issus de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge* (Thèse de doctorat). Université Laval, Québec, CA.
- Meda NR, Fraisse D, Gnoula C, et al. (2017a) Characterization of antioxidants from *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. leaves using HPLC-DAD coupled with pre-column DPPH assay. *Eur. Food Res. Technol.* 243(9), 1659-1666. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2873-7>
- Meda NR, Poubelle PE et Stevanovic T (2017b) Antioxidant capacity, phenolic constituents and toxicity of hot water extract from red maple buds. *Chem. Biodivers.* 17(6), 1-12. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700028>
- Meda NR, Rott M, Suwal S, et al. (2017c) Chemometrics-Based Approach to Analysis of Phenolic Fingerprints of Red and Sugar Maple Bud Extracts. *Austin Biochem* 2(1), 1009.
- Meda NR, Suwal S, Rott M, et al. (2017d) Investigation of extracts from red and sugar maple buds as potential sources of antioxidant phytochemicals. *Curr. Top. Phytochem.* 13, 69-78.
- MERN (2002) *Les écorces au Québec* (2 p.). Québec : Direction du développement de l'industrie des produits forestiers. Ministère des ressources naturelles.
- MERN (2015) *Politique énergétique 2016-2025 : les énergies renouvelables* (132 p.). Québec : Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles.
- Meslet-Cladiere L, Delage L, Leroux CJ-J, et al. (2013) Structure/Function Analysis of a Type III Polyketide Synthase in the Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* Reveals a Biochemical Pathway in Phlorotannin Monomer Biosynthesis. *Plant Cell* 25(8), 3089-3103. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111336>
- Mészáros E, Jakab E et Várhegyi G (2007) TG/MS, Py-GC/MS and THM-GC/MS study of the composition and thermal behavior of extractive components of *Robinia pseudoacacia*. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 79(1-2), 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2006.12.007>
- Miguel MG, Doughmi O, Aazza S, et al. (2014) Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* 23(1), 313-322. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0044-1>
- Miller JM (2005) *Chromatography, concepts and contrasts*. 2nd éd. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc. 490 p.

- Mishra K, Ojha H et Chaudhury NK (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* 130(4), 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Moßhammer MR, Stintzing FC et Carle R (2006) Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7(4), 275-287. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.04.003>
- Mueller JP et Liceaga AM (2016) Characterization and Cryoprotection of Invasive Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Protein Hydrolysates. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 25(1), 131-143. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.832452>
- Narayanan V et Seshadri TR (1969) Chemical components of *Acer rubrum* wood and bark: Occurrence of procyanidin dimer and trimer. *Indian J. Chem.* 7(3), 213-214.
- Nguyen VT, Pham HNT, Bowyer MC, et al. (2016) Influence of solvents and novel extraction methods on bioactive compounds and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*. *Chem. Pap.* 70(5), 556-566. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0240>
- Ning YC (2011) *Interpretation of Organic Spectra*. Hoboken : John Wiley & Sons. 412 p.
- Nitta K, Ogawa Y, Negishi F, et al. (1999) Hot water extract of bark of Nikko maple (*Acer nikoense*) induces apoptosis in leukemia cells. *Biol. Pharm. Bull.* 22(4), 378-381.
- Nkhili E, Tomao V, El Hajji H, et al. (2009) Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochem. Anal.* 20(5), 408-415. <https://doi.org/10.1002/pca.1141>
- Nonier MF, Vivas N, Vivas de Gaulejac N, et al. (2006) Pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry of *Quercus* sp. wood. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 75(2), 181-193. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2005.05.006>
- Nyström M, Kaipia L et Luque S (1995) Fouling and retention of nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 98(3), 249–262.
- Olennikov D, Kashchenko N et Chirikova N (2014) A Novel HPLC-Assisted Method for Investigation of the Fe<sup>2+</sup>-Chelating Activity of Flavonoids and Plant Extracts. *Molecules* 19(11), 18296-18316. <https://doi.org/10.3390/molecules191118296>
- Olivon F, Roussi F, Litaudon M, et al. (2017) Optimized experimental workflow for tandem mass spectrometry molecular networking in metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 409(24), 5767-5778. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0523-3>
- Otieno DO et Ahring BK (2012) The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydr. Res.* 360, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>
- Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL (2001) Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* 49(10), 4619-4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ou J et Sun Z (2014) Feruloylated oligosaccharides: Structure, metabolism and function. *J. Funct. Foods* 7, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.028>
- Park KH, Yoon KH, Yin J, et al. (2017) Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Galloyl Derivatives and Antidiabetic Activities of *Acer ginnala*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/6945912>

- Pascual ME, Carretero ME, Slowing KV, et al. (2002) Simplified screening by TLC of plant drugs. *Pharm. Biol.* 40(2), 139–143.
- Pérez-López P, González-García S, Jeffryes C, et al. (2014) Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *J. Clean. Prod.* 64, 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.011>
- Peyrat-Maillard MN, Cuvelier M-E et Berset C (2003) Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(10), 1007-1012. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0812-z>
- Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, et al. (2012) Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chem. Phys. Lipids* 165(6), 638-647. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003>
- Pizzi A (2016) Natural Adhesives, Binders, and Matrices for Wood and Fiber Composites: Chemistry and Technology. Dans *Lignocellul. Fibers Wood Handb. Renew. Mater. Today's Environ.* pp. 131. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc.
- Porter LJ, Hrstich LN et Chan BG (1985) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25(1), 223-230.
- Pranovich A, Holmbom B et Willför S (2016) Two-stage hot-water extraction of galactoglucomannans from spruce wood. *J. Wood Chem. Technol.* 36(2), 140-156. <https://doi.org/10.1080/02773813.2015.1104543>
- Prasad KN, Yang E, Yi C, et al. (2009) Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10(2), 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.007>
- Prior RL, Wu X et Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Prodanov M, Vacas V, Hernández T, et al. (2013) Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. *J. Food Compos. Anal.* 31(2), 284-292. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.003>
- Qi J, Chen Y-H, Wang Y, et al. (2016) Screening of peroxynitrite scavengers in *Flos Lonicerae* by using two new methods, an HPLC-DAD-CL technique and a peroxynitrite spiking test followed by HPLC-DAD analysis. *Phytochem. Anal.* 27(1), 57-63. <https://doi.org/10.1002/pca.2599>
- Qu W, Pan Z et Ma H (2010) Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *J. Food Eng.* 99(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, et al. (2011) Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50(3), 586-621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- radcyberzine.com (2002) xglobe & xplanet maps. Récupéré de [http://www.radcyberzine.com/xglobe/caida\\_bw\\_1280.jpg](http://www.radcyberzine.com/xglobe/caida_bw_1280.jpg)
- Raorane ML, Narciso JO et Kohli A (2016) Total Soluble Protein Extraction for Improved Proteomic Analysis of Transgenic Rice Plant Roots. Dans MacDonald, J, Kolotilin, I, et Menassa, R (dir.), *Recomb. Proteins Plants Methods Protoc.* pp. 139-147. New York : Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3289-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3289-4_10)

- Ratti C (2013) Freeze drying for food powder production. Dans *Handb. Food Powders*. pp. 57-84. Sawston, Cambridge : Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.1.57>
- Ray AB, Chattopadhyay SK, Kumar S, et al. (1985) Structures of cleomiscosins, coumarinolignoids of *Cleome viscosa* seeds. *Tetrahedron* 41(1), 209-214.
- Rayavarapu S, Yarla NS, Kadiri SK, et al. (2017) Synthesis of Saccharumoside-B analogue with potential of antiproliferative and pro-apoptotic activities. *Sci. Rep.* 7(1), 8309. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05832-w>
- Rébénaque P, Rawyler A, Boldi M-O, et al. (2015) Comparison Between Sensory and Nephelometric Evaluations of Tannin Fractions Obtained by Ultrafiltration of Red Wines. *Chemosens. Percept.* 8(1), 33-43. <https://doi.org/10.1007/s12078-015-9175-x>
- Reddy VS, Dash S et Reddy AR (1995) Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L.): identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. *Theor. Appl. Genet.* 91(2), 301–312.
- Riedl K, Girard B et Lencki RW (1998) Influence of membrane structure on fouling layer morphology during apple juice clarification. *J. Membr. Sci.* 139(2), 155–166.
- Rizvi S (dir.) (2010) *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*. 1st éd. Cambridge : Woodhead Publishing. 694 p.
- Rosales-Castro M, Honorato-Salazar JA, Reyes-Navarrete MG, et al. (2015) Antioxidant phenolic compounds of ethanolic and aqueous extracts from pink cedar (*Acrocarpus fraxinifolius* Whight & Arn.) bark at two tree ages. *J. Wood Chem. Technol.* 35(4), 270-279. <https://doi.org/10.1080/02773813.2014.946619>
- Ross RJ (2010) *Wood Handbook: wood as an engineering material*. centennial. Madison : U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. 509 p.
- Rostagno MA et Prado JM (2013) *Natural Product Extraction: Principles and applications*. Londres : Royal Society of Chemistry. 500 p. <https://doi.org/10.1039/9781849737579>
- Royer M, Diouf PN et Stevanovic T (2011) Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food Chem. Toxicol.* 49(9), 2180-2188. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.003>
- Royer M, Houde R et Stevanovic T (2010) *Potentiel de développement lié aux extractibles forestiers : État des connaissances et revue des marchés. Volet 1 : Les extractibles forestiers québécois* (145 p.). Québec : Quebec Wood Export Bureau.
- Rupasinghe V, Neir SV et Parmar I (2016) Polyphenol characterization, anti-oxidant, anti-proliferation and anti-tyrosinase activity of cranberry pomace. *Funct. Foods Health Dis.* 6(11), 754–768.
- Rydberg J (2004) *Solvent extraction principles and practice*. Boca Raton : CRC Press. 480 p.
- Sager EPS, Hutchinson TC et Croley TR (2005) Foliar Phenolics in Sugar Maple (*Acer saccharum*) as a Potential Indicator of Tropospheric Ozone Pollution. *Environ. Monit. Assess.* 105(1-3), 419-430. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-4439-6>
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, et al. (2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>

- Sang S, Hou Z, Lambert JD, et al. (2005) Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid. Redox Signal.* 7(11-12), 1704–1714. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1704>
- Santana ÁL et Meireles MAA (2016) Thin-Layer Chromatography Profiles of Non-Commercial Turmeric (*Curcuma longa* L.) Products Obtained via Partial Hydrothermal Hydrolysis. *Food Public Health* 6(1), 15–25.
- Sarker SD, Latif Z et Gray AI (dir.) (2005) *Natural products isolation*. 2nd ed. Totowa, N.J : Humana Press. 515 p.
- Scalbert A, Monties B et Janin G (1989) Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* 37(5), 1324–1329.
- Schaich KM, Tian X et Xie J (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods* 14, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Schell DJ et Harwood C (1994) Milling of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45(1), 159–168.
- Schuck P, Jeantet R, Tanguy G, et al. (2015) Energy Consumption in the Processing of Dairy and Feed Powders by Evaporation and Drying. *Dry. Technol.* 33(2), 176-184. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.942913>
- Seeram NP, Ma H et Parang K (2017) Methods for skin whitening using a gallotannin. US20170029397 A1. Rhode Island Board Of Education, State Of Rhode Island & Providence Plantations.
- Shi X, Wang H et Zhang F (2009) Genotypic difference in resistance to internal bark necrosis in apple trees is related to manganese uptake, the distribution of manganese, and antioxidant activity. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 40(9-10), 1645-1657. <https://doi.org/10.1080/00103620902832014>
- Singleton VL et Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3), 144–158.
- Skalicka-Woźniak K et Garrard I (2014) Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. *Phytochem. Rev.* 13(2), 547-572. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9348-2>
- Sogi DS, Siddiq M et Dolan KD (2015) Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. *LWT - Food Sci. Technol.* 62(1), 564-568. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.015>
- Srivastava LM (1964) Anatomy, chemistry, and physiology of bark. Dans *Int. Rev. For. Res.*, 1, pp. 203-277. [s.l.] : John A. Romberger and Peitsa Mikola.
- StataCorp LP (2013) cluster stop — Cluster-analysis stopping rules. Dans *STATA Multivar. Stat. Ref. Man. Release 13*. pp. 167-174. College Station : Stata Press.
- Stevanovic T et Perrin D (2009) *Chimie du bois*. Nancy : Presses polytechniques et universitaires romandes. 241 p.
- St-Pierre F, Achim A et Stevanovic T (2013) Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Ind. Crops Prod.* 41, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.027>

- St-Pierre P, Pilon G, Dumais V, et al. (2014) Comparative analysis of maple syrup to other natural sweeteners and evaluation of their metabolic responses in healthy rats. *J. Funct. Foods* 11, 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.001>
- Strack D (1997) Phenolic metabolism. Dans *Plant Biochem*. San Diego : Acad. Press.
- Sun J, Ma H, Seeram NP, et al. (2016) Detection of Inulin, a Prebiotic Polysaccharide, in Maple Syrup. *J. Agric. Food Chem.* 64(38), 7142-7147. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03139>
- Tang D, Li H-J, Chen J, et al. (2008) Rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb *Flos Lonicerae Japonicae* by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS. *J. Sep. Sci.* 31(20), 3519-3526. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800173>
- Tattar TA et Rich AE (1973) Extractable phenols in clear, discolored, and decayed woody tissues and bark of sugar maple and red maple. *Phytopathology* 63(1), 167-169.
- techni-contact.com (2016) Evaporation sous vide. Récupéré de <https://www.techni-contact.com/familles/evaporateur-sous-vide.html>
- Thakur ML (1977) Phenolic growth inhibitors isolated from dormant buds of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). *J. Exp. Bot.* 28(4), 795-803.
- Thermo Fisher Scientific (2010) *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook*. 2<sup>e</sup> éd. [s.l.] : Thermo Scientific. 44 p.
- Trockenbrodt M (1990) Survey and discussion of the terminology used in bark anatomy. *IAWA Bull Ns* 11(2), 141-166.
- Trombley JD, Loegel TN, Danielson ND, et al. (2011) Capillary electrophoresis methods for the determination of covalent polyphenol-protein complexes. *Anal. Bioanal. Chem.* 401(5), 1523-1529. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4846-1>
- Tsimogiannis D, Bimpilas A et Oreopoulou V (2017) DPPH Radical Scavenging and Mixture Effects of Plant o-Diphenols and Essential Oil Constituents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119(9), 1-9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.2016003473>
- universe-review.ca (2002) Anatomy of Plants. [Récupéré de https://universe-review.ca/I10-22a-stem.jpg](https://universe-review.ca/I10-22a-stem.jpg)
- Valls R-M, Llauroadó E, Fernández-Castillejo S, et al. (2016) Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from french maritime pine bark on cardiovascular disease risk factors in stage-1 hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial. *Phytomedicine* 23(12), 1451-1461. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.08.007>
- Vaucher H (1993) *Guide des écorces*. Neuchâtel : Delachaux et Niestlé. 15-37 p.
- Vercauteren J (2011) *Cours de pharmacognosie générale*. Université Montpellier 1. [Récupéré de http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2009\\_Montpellier\\_Vercauteren\\_Pharmacognosie.pdf](http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2009_Montpellier_Vercauteren_Pharmacognosie.pdf)
- Vincze I et Vatai G (2004) Application of nanofiltration for coffee extract concentration. *Desalination* 162, 287-294.
- Wallace TC et Giusti MM (2010) Evaluation of Parameters that Affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols and Proanthocyanidins. *J. Food Sci.* 75(7), C619-C625. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01734.x>
- Wan C, Yuan T, Li L, et al. (2012a) Maplexins, new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 597-600. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.073>

- Wan C, Yuan T, Xie M, et al. (2012b) *Acer rubrum* phenolics include A-type procyanidins and a chalcone. *Biochem. Syst. Ecol.* 44, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.04.005>
- Weber K et Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16), 4406–4412.
- Webster GK (2014) *Supercritical fluid chromatography: advances and applications in pharmaceutical analysis*. Boca Raton : CRC Press.
- Wei S, Chen H et Lin Y (2015) Comparison of chemical compositions and antioxidant activities of condensed tannins from different parts of *Calliandra haematocephala*. *J. Wood Chem. Technol.* 35(3), 193-206. <https://doi.org/10.1080/02773813.2014.919596>
- Wetzel S, Demmers C et Greenwood JS (1989) Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. *Planta* 178(3), 275–281.
- Widsten P, Cruz CD, Fletcher GC, et al. (2014) Tannins and Extracts of Fruit Byproducts: Antibacterial Activity against Foodborne Bacteria and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* 62(46), 11146-11156. <https://doi.org/10.1021/jf503819t>
- Wilkinson L, Engelman L, Corter J, et al. (1998) Cluster Analysis. Dans *SYSTAT 80 Stat.* pp. 65-124. Chicago : Wilkinson, Leland Eds.; SPSS Inc.
- Wojdyr M (2010) Fityk: a general-purpose peak fitting program. *J. Appl. Crystallogr.* 43(5), 1126–1128. <https://doi.org/10.1107/S0021889810030499>
- Wu D, Wu X-D, You X-F, et al. (2010) Inhibitory effects on bacterial growth and b-ketoacyl-ACP reductase by different species of maple leaf extracts and tannic acid. *Phytother. Res.* 24(S1), S35-S41. <https://doi.org/10.1002/ptr.2873>
- Xia Z, Singh A, Kiratitanavit W, et al. (2015) Unraveling the mechanism of thermal and thermo-oxidative degradation of tannic acid. *Thermochim. Acta* 605, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.02.016>
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, et al. (1998) HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(6), 1201-1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>
- Yang H, Huang Z, Chen Y, et al. (2016) Evaluation of the contributions of polyphenols in Chinese propolis by on-line HPLC–ABTS method. *Eur. Food Res. Technol.* 242(4), 537-546. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2564-1>
- Yoshikawa K, Kawahara Y, Arihara S, et al. (2011) Aromatic compounds and their antioxidant activity of *Acer saccharum*. *J. Nat. Med.* 65(1), 191-193. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0450-5>
- Yoshioka H, Sugiura K, Kawahara R, et al. (1991) Formation of Radicals and Chemiluminescence during the Autoxidation of Tea Catechins. *Agric. Biol. Chem.* 55(11), 2717-2723. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10857148>
- Yuan T, Li L, Zhang Y, et al. (2013) Pasteurized and sterilized maple sap as functional beverages: Chemical composition and antioxidant activities. *J. Funct. Foods* 5(4), 1582-1590. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.06.009>
- Yuan T, Wan C, González-Sarriás A, et al. (2011) Phenolic glycosides from sugar maple (*Acer saccharum*) bark. *J. Nat. Prod.* 74(11), 2472-2476. <https://doi.org/10.1021/np200678n>
- Yuan T, Wan C, Liu K, et al. (2012) New maplexins F–I and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron* 68(4), 959-964. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.062>

- Zhang Y, Yuan T, Li L, et al. (2014) Chemical Compositional, Biological, and Safety Studies of a Novel Maple Syrup Derived Extract for Nutraceutical Applications. *J. Agric. Food Chem.* 62(28), 6687-6698. <https://doi.org/10.1021/jf501924y>
- Zhang Y-P, Shi S-Y, Xiong X, et al. (2012) Comparative evaluation of three methods based on high-performance liquid chromatography analysis combined with a 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay for the rapid screening of antioxidants from *Pueraria lobata* flowers. *Anal. Bioanal. Chem.* 402(9), 2965-2976. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5722-3>
- Ziyatdinova GK, Budnikov HC et Pogorel'tzev VI (2005) Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 381(8), 1546-1551. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3132-5>