

Table des matières

Résumé.....	3
Remerciements.....	4
Liste des figures	7
Liste des tableaux.....	9
CHAPITRE I.....	10
INTRODUCTION	10
Mise en contexte	11
Objectif général.....	11
CHAPITRE II	13
REVUE DE LITTÉRATURE.....	13
Le <i>Rhododendron groenlandicum</i>	14
La famille <i>Ericaceae</i>	14
Le genre <i>Rhododendron (Ledum)</i>	14
Le <i>Rhododendron groenlandicum</i> (Oeder) Kron et Judd.....	14
Études précédentes	20
CHAPITRE III	21
ISOLATION, CARACTERISATION ET ACTIVITÉS DE COMPOSÉS PRÉSENTS DANS LES FLEURS DE <i>RHODODENDRON GROENLANDICUM</i>	21
Résumé.....	22
CHAPITRE IV	35
COMPARAISON DES HUILES ESSENTIELLES DE FLEURS ET DE FEUILLES DE <i>RHODODENDRON GROENLANDICUM</i>	35
Résumé.....	36
CONCLUSION	45
Bibliographie.....	47
ANNEXES	53
Matériel & Méthodes	60

Extractions des fleurs de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	60
Résultats	60
Extractions des fleurs de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	60
Matériel et Méthodes	62
Extraction des feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	62
Fractionnement et isolation des composés contenus dans les feuilles	62
Résultats	63
Extraction des feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	63
Extraction à grand échelle des feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	63
Extraction liquide-liquide des feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	63
Colonne DIAION de l'extrait butanolique de feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i> ..	64
Colonne basse pression de la fraction D de la colonne DIAION de feuille de <i>Rhododendron groenlandicum</i>	65
Composés identifiés par HPLC	66

Liste des figures

Figure 1 : <i>R. groenlandicum</i> (Source : http://www.florelaurentienne.com/flore/Groupes/Spermatophytes/Angiospermes/Dicotyles/077_ericacees/06_Ledum/groenlandicum.htm).....	15
Figure 2: Distribution du <i>R. groenlandicum</i> (Source : Bog Labrador tea distribution from USDA-NRCS PLANTS).....	15
Figure 1: Molecular structures of isolated compounds from <i>R. groenlandicum</i>	29
Figure 1: Flowers essential oil GC-MS chromatogram.....	42
Figure 2: Leaves essential oil GC-MS chromatogram.....	42
Figure 3 : Spectre ¹ H de la Quercitrine.....	54
Figure 4 : Spectre ¹³ C de la quercitrin.....	55
Figure 5 : Spectre ¹ H de l'avicularin.....	55
Figure 6 : Spectre ¹³ C de l'avicularin.....	56
Figure 7 : Spectre ¹ H de l'afzelin.....	56
Figure 8 : Spectre DEPT135 de l'afzelin.....	57
Figure 9 : Spectre ¹ H de la catéchine	57
Figure 10 : Spectre ¹³ C de la catéchine.....	58
Figure 11 : Spectre ¹ H de l'épicatéchine.....	58
Figure 12 : Spectre ¹³ C de l'épicatéchine.....	59
Figure 13 : CCM de l'extraction liquide-liquide.....	64
Figure 14 : CCM récapitulative de la colonne DIAION réalisée sur l'extrait butanolique de feuille de <i>R. groenlandicum</i>	64

Figure 15 : CCM récapitulative de la colonne DIAION réalisée sur la fraction D de la colonne DIAION de l'extrait butanolique de feuilles de *R. groenlandicum*66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Constituants principaux de <i>R. groenlandicum</i> (Chartier <i>et al.</i> 2005; Dufour <i>et al.</i> 2007).....	16
Tableau 2 : Utilisations du thé du Labrador par les amérindiens.....	17
Table 1: Characterization of compounds.....	27
Table 2: Antioxidant activity of extract and isolated compounds	30
Table 1: Composition of the essentials oils of flowers and leaves from <i>R. groenlandicum</i>	40
Table 2: Antioxidant and anti-inflammatory activities of <i>R. groenlandicum</i> essential oils using cell-based assays.....	43
Tableau 3 : Récapitulatif des extractions de fleurs.....	60
Tableau 4 : Rendement des extractions de fleurs.....	60
Tableau 5 : Récapitulatif des extractions de feuilles	62
Tableau 6 : Rendement des extractions de feuilles.....	63
Tableau 7 : Résultats biologiques antioxydant des fractions de colonne DIAION sur l'extrait butanolique de feuilles.....	65
Tableau 8 : Résultats biologiques antioxydant des fractions de colonne basse pression de l'extrait de feuilles.....	66

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Mise en contexte

Le *Rhododendron groenlandicum*, plus communément appelé thé du Labrador, est un arbuste de la famille des éricacées, facilement reconnaissable à ses feuilles inférieurement tomenteuses. Il se trouve en forêt, plus précisément dans les endroits humides tels que les tourbières, les fondrières et les boisés humides de conifères (Frère Marie-Victorin 1935). C'est une plante abondante dont les amérindiens se servaient pour divers soins comme les rhumes, l'asthme ou encore les maux de ventre. Ils se servaient de la poudre de racine pour l'appliquer sur les ulcères ainsi que de la poudre de feuille pour soigner les brûlures. Les amérindiens utilisaient également l'infusion de *R. groenlandicum* comme tonique, diurétique, pour soigner les rhumatismes et provoquer l'accouchement des femmes enceintes lorsque ces dernières avaient du retard (Chartier *et al.* 2005).

Des études ont déjà été réalisées sur des extraits de feuilles de *R. groenlandicum* (Dufour *et al.* 2007). Plusieurs composés bioactifs, tels que des composés phénoliques et des triterpènes, ont été identifiés incluant la quercétine, la catéchine, l'uvaol, l'acide oléanolique et l'acide ursolique (Dufour *et al.* 2007). Les extraits de feuilles de *R. groenlandicum* ont montré des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire. La quercétine et la catéchine sont en partie responsable de l'activité antioxydante alors que l'acide ursolique est responsable de l'activité anti-inflammatoire (Dufour 2006). Cependant, la composition chimique et l'activité biologique des fleurs n'ont jamais été étudiées jusqu'à maintenant.

L'objectif principal de ce projet visait à étudier la composition chimique et l'activité biologique d'extraits de fleurs de *R. groenlandicum*. Un second objectif visait aussi à approfondir la caractérisation chimique des extraits de feuilles.

Objectif général

Étudier la composition chimique et l'activité biologique d'extraits des fleurs de *R. groenlandicum*.

Objectifs spécifiques

- Récolter et extraire les fleurs de *R. groenlandicum* par macération et par hydrodistillation.

- Caractériser la composition chimique des extraits par différentes approches chromatographiques et analytiques.
- Évaluer l'activité biologique des extraits notamment les activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

Clicours.COM

Le Rhododendron groenlandicum

La famille *Ericaceae*

Cette famille contient plus de 90 genres et près de 1500 espèces, formant une grande partie de la flore américaine et canadienne notamment dans les tourbières et les toundras. Elle fait partie du groupe des angiospermes et contient 145 genres, dont celui du *Rhododendron* (Frère Marie-Victorin 1935).

Les éricacées sont des plantes généralement ligneuses. Leurs feuilles sont, pour la plupart, alternes, simples, sans stipules et souvent persistantes. Les fleurs sont habituellement régulières et hermaphrodites, avec un calice à sépales libres ou concrescents et quelques fois nuls. La corolle à pétales est normalement concrescente sur une longueur plus ou moins grande. Les étamines sont au nombre de 10, regroupées en deux verticilles. L'ovaire est pluriloculaire et de style unique. Enfin, le fruit est une capsule, une drupe ou encore une baie (Frère Marie-Victorin 1935). La plupart des éricacées sont riches en tannins (Frère Marie-Victorin 1935).

Le genre *Rhododendron (Ledum)*

Le genre *Rhododendron*, fait parti de la famille des éricacées et comprend environ 610 espèces, dont *R. groenlandicum*, ou anciennement *Ledum groenlandicum*. Ce genre est divisé en plusieurs sous-sections, dont l'une était appelée *Ledum*. Cette classification a été modifiée après que Kron et Judd ait mené des recherches sur la nature monophylétique du genre *Rhododendron*. Ils ont conclu que le genre *Ledum* était congénérique du genre *Rhododendron* (Harmaja 1991; Judd *et al.* 2009). Les plantes du sous-genre *Rhododendron (Ledum)* sont des arbrisseaux à feuilles alternes et persistante. Leurs fleurs sont blanches, disposées en corymbe ou ombelle avec un calice minuscule voire nul. Elles comptent 5 pétales, et 5 à 10 étamines. On compte environ 5 espèces dans l'hémisphère boréale (Frère Marie-Victorin 1935).

Le *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron et Judd

Le *R. groenlandicum*, également appelé thé du Labrador, thé de James ou encore lédon du Groenland, est un arbrisseau (long. 30-120 cm.) de la famille des Éricacées à rameaux densément tomenteux et à feuilles alternes, persistantes et odorantes lorsqu'elles sont froissées. Celles-ci sont vertes supérieurement, densément brunes-tomenteuses inférieurement et à bords fortement révolutés. Ses fleurs (larg. 8-10 mm.) sont blanches,

disposées en ombelles ou en corymbe avec un calice minuscule. La capsule est à déhiscence septicide depuis la base (Frère Marie-Victorin 1935).



Figure 1 : *R. groenlandicum*
(Source : http://www.florelaurentienne.com/flore/Groupes/Spermatophytes/Angiospermes/Dicotyles/077_ericacees/06_Ledum/groenlandicum.htm)

Le *R. groenlandicum* a une floraison printanière. On le retrouve dans les tourbières, les fondrières et les boisés humides de conifères, surtout les forêts d'épinettes noires. Il est répandu dans son milieu. En effet, il est présent dans le Nord des États-Unis, au Canada et au Groenland (Frère Marie-Victorin 1935; Chartier *et al.* 2005). *R. groenlandicum* s'adapte bien au climat boréal ainsi qu'au climat frais. Il est capable de supporter de larges gammes de températures et de précipitations. Il est considéré comme nuisible car il empêche et ralentit le développement de plusieurs espèces végétales en forêt boréale ce qui a un impact négatif sur la biodiversité. Cette espèce utilise très efficacement les ressources du milieu, en compétitionnant les autres espèces, notamment pour les nutriments du sol. De plus son intolérance à l'ombre expliquerait que *R. groenlandicum* soit l'un des premiers colonisateurs après un feu. Il contribue également à modifier la chimie du sol, inhibant ainsi la régénération et la croissance de l'épinette noire (Dufour 2006; Hébert et Thiffault 2011).

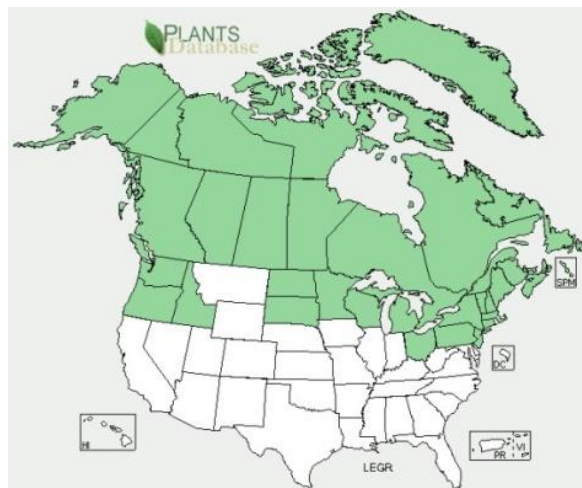


Figure 2: Distribution du *R. groenlandicum* (Source : Bog Labrador tea distribution from USDA-NRCS PLANTS)

R. groenlandicum est diurétique, anti-inflammatoire grâce à la quercétine, antiseptique urinaire et dépigmentant de la peau par inhibition compétitive de la tyrosinase, à

propriétés éclaircissantes par l'arbutine. Il pourrait avoir les propriétés suivantes, selon la société Eureka Medicinal, une entreprise spécialisée distribuant uniquement le *R. groenlandicum*: action antispasmodique, régénératrice hépatocellulaire, décongestionnante pour le foie, analgésique, antitumorale, antioxydante, source de vitamine C, stimulant digestif, anti-flatulente et expectorante (Chartier *et al.* 2005). Les constituants principaux du Lédon du Groenland sont regroupés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Constituants principaux de *R. groenlandicum* (Chartier *et al.* 2005; Dufour *et al.* 2007)

Famille	Composés
Flavonoïdes	Quercétine, hyperoside, arbutine
Huile essentielle	<u>Monoterpènes</u> : alpha-pinène, bêta-pinène, sabinène, limonène, gamma-terpinène <u>Terpinènes</u> : sélinène Cétones : monoterpéniques et sesquiterpéniques (germacrone) <u>Alcools monoterpéniques</u> : alpha-terpinéol ; terpinène-1-ol-4 <u>Alcools sesquiterpéniques</u> : lédol <u>Esters terpéniques</u> : acétate et butyrate de bornyl Aldéhydes terpéniques : myrténal
Oligoéléments minéraux	Calcium (Ca), azote (N), magnésium (Mg), cuivre (Cu), zinc (Zn), fer (Fe), manganèse (Mn), molybdène (Mo), chlore (Cl)
Substance nutritives	Protéines, Graisses, Hydrate de carbone
Tanin catéchique	
Terpènes	Acide ursolique
Vitamines	Thiamine, Riboflavine, Niacine, Vitamine C

Les feuilles étaient utilisées par les amérindiens sous forme d'infusion, d'où son nom commun : Thé du Labrador. Il était connu pour traiter des maladies impliquant l'inflammation comme les brûlures, les rhumatismes et l'asthme. Il était aussi utilisé pour traiter certains problèmes rénaux, digestifs et respiratoires. L'infusion servait à laver les plaies, les piqûres d'insectes et les éruptions de la peau. Pour faciliter l'accouchement, les

femmes amérindiennes en prenaient 3 fois par jour car le *R. groenlandicum* serait un stupéfiant léger et permettrait également de déclencher l'accouchement (Frère Marie-Victorin 1935; Moerman 1998; Chartier *et al.* 2005; Hébert et Thiffault 2011). Le tableau 2 ci-dessous résume l'utilisation médicinale traditionnelle du *R. groenlandicum* par les différentes nations d'amérindiennes.

Tableau 2 : Utilisations du thé du Labrador par les amérindiens

Partie utilisée	Usage	Nation	Forme	Références
Feuilles	traitement inflammation nasale	Abnaki	Poudre	Rousseau 1946
	traitement contre les maux d'estomac	Bella Coola	décoction	Smith 1929
	traitement contre les brûlures	Cree	pommade	Beardsley 1941
		Cree, Woodlands	cataplasme	Leighron 1985
	Diurétique	Cree	infusion	Beardsley 1941
		Mimac	décoction	Speck 1917
		Gitksan	décoction	Smith 1929
	soigner les blessures	Cree, Hudson Bay	cataplasme	Holmes 1884
	traitement du sein	Cree, Woodlands	cataplasme	Leighron 1985
	contre les éruptions cutanées (bébé)	Cree, Woodlands	poudre	Leighron 1985
	traitement contre le rhume	Haisla & Hanaksiala	infusion	Compton 1993
		Kitasoo	décoction	Compton 1993
		Micmac	non précisé	Chandler <i>et al.</i> 1979
		Oweekeno	infusion	(Compton 1993)

	traitement contre la tuberculose	Haisla & Hanaksiala	infusion	(Compton 1993)
	maux respiratoire	Kitasoo	decoction	Compton 1993
	Narcotic	Kwakiutl	non précisé	Turner et Bell 1973
	purificateur de sang	Makah	infusion	Gunther 1973
	traitement contre les problèmes rénaux	Makah	infusion	Gill 1983
		Malecite	infusion	Gill 1983
		Micmac	non précisé	Chandler <i>et al.</i> 1979
		Okanagan-colville	infusion	Turner <i>et al.</i> 1983
	traitement contre le scorbut	Micmac	non précisé	Chandler <i>et al.</i> 1979
	traitement contre l'asthme	Micmac	non précisé	Chandler <i>et al.</i> 1979
	Tonic	Micmac	infusion	Speck 1917
	traitement contre le mal de gorge	Oweekeno	infusion	Compton 1993
	traitement contre les rhumatismes	Quinault	infusion	Gunther 1973
Racines	traitement contre les brûlures	Chippewa	poudre	Densmore 1928
	traitement contre les ulcères	Chippewa	poudre	Densmore 1928
Fleurs	traitement contre les piqûres d'insectes	Cree, Hudson Bay	infusion	Holmes 1884
	traitement contre les rhumatismes	Cree, Hudson Bay	infusion	Holmes 1884
Feuilles + brindilles	purificateur de sang	Montagnais	infusion	Speck 1917
	traitement contre les coups de froid	Montagnais	infusion	Speck 1917; Burgesse 1944

Bois	traitement contre les irritations de la peau	Cree, Hudson Bay	poudre	Holmes 1884
Plante entière	Analgésique	Algonquin	infusion	Black 1980
	traitement contre le rhume	Algonquin	infusion	Black 1980
	lavage des brûlures	Cree, Woodlands	décoction	Leighron 1985
	démangeaisons de la peau, lésions des mains et peau gercée	Cree, Woodlands	décoction	Leighron 1985
	Diurétique	Cree, Woodlands	non précisé	Leighron 1985
	traitement contre la coqueluche	Cree, Woodlands	décoction	Leighron 1985
	traitement contre la pneumonie	Cree, Woodlands	décoction	Leighron 1985
	Tonic	Nitinaht	infusion	Turner <i>et al.</i> 1983
	traitement contre la fièvre	Montagnais	cataplasme ou infusion	Burgesse 1944
traitement contre la jaunisse	Montagnais	cataplasme ou infusion	Burgesse 1944	

De nos jours, les feuilles de *R. groenlandicum* sont utilisées en tisane. La poudre de feuille par voie orale est utilisée pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures (toux, bronchite, asthme), la fièvre, les infections stomatologiques. De plus, il est possible d'utiliser le *R. groenlandicum* ou son huile essentielle comme stimulant hépatique, voire comme anti-hépatotoxique. Il peut également soigner les douleurs et contractions musculaires, affection rhumatismale par voie externe (Chartier *et al.* 2005; Goetz 2005).

Études précédentes

Une étude a montré qu'un extrait méthanolique des feuilles de *R. groenlandicum* pouvaient inhiber les enzymes P450s, lesquels sont impliqués dans la métabolisation des médicaments (Hébert et Thiffault 2011).

D'autre part, le laboratoire a étudié la composition et l'activité biologique des feuilles de *R. groenlandicum*. Ils ont ainsi pu montrer qu'un extrait feuille possédait une activité antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Ils ont notamment découvert que l'acide ursolique, était cytotoxique, pour des cellules du cancer du côlon et du poumon. Ce composé est également responsable en partie, de l'activité anti-inflammatoire de *R. groenlandicum*. Enfin, l'activité antioxydante de la plante serait due aux composés phénoliques tels que la quercétine ou la catéchine (Dufour *et al.* 2007). Les extraits de *R. groenlandicum* ont aussi démontré une activité antidiabétique *in vivo* (Tam *et al.* 2009).

La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *R. groenlandicum* a également été étudiée. Elle est constituée d' α et β -pinènes, de sabinène, de sesquiterpènes (α -sélinène et sélinadiène) et de cétones terpéniques, comme le germacrone. L'huile essentielle posséderait plusieurs propriétés incluant la stimulation digestive, la décongestion et la régénération hépatocytaire. Elle serait également anti-inflammatoire, antalgique et antispasmodique. Il a aussi été suggéré que l'huile essentielle de *R. groenlandicum* augmenterait la tolérance et la réponse aux traitements de l'hépatite B et C (Belleau 1990; Giraud-Robert 2005).

CHAPITRE III

ISOLATION, CARACTERISATION ET ACTIVITÉS DE COMPOSÉS PRÉSENTS DANS LES FLEURS DE *RHODODENDRON GROENLANDICUM*

Ce chapitre présente un article scientifique concernant l'isolement de composés à partir de fleurs de thé de Labrador ainsi que leurs caractérisations et leurs activités biologiques. L'article intégral est précédé d'un résumé en français.

Résumé

Le *Rhododendron groenlandicum* est connu pour être un très bon antioxydant, en plus d'être une plante anti-inflammatoire et cytotoxique. Ici, les recherches ont porté sur les fleurs de celui-ci, n'ayant jamais été étudiées auparavant. Cinq composés connus ont été isolés et identifiés par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C ainsi que par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV et un spectromètre de masse (HPLC-UV/MS) : la quercitrine (**1**), l'avicularine (**2**), l'afzelin (**3**), la catéchine (**4**) et l'épicatéchine (**5**). Tous ces composés ont été testés biologiquement et ils se sont tous révélés antioxydant avec des IC_{50} respectifs de $0,19 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,19 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$, $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,18 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ et $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$.

Isolation, characterization and activity of extract and compounds from the flowers of *Rhododendron groenlandicum*

Marion Étienne, François Simard, André Pichette, Jean Legault

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555, Boulevard de l'Université,

Chicoutimi, Québec, Canada G7H 2B1

Abstract

Rhododendron groenlandicum is known to be a very good antioxidant, in addition to being an anti-inflammatory and cytotoxic plant. This research focused on the flowers of *R. groenlandicum*, which have never been studied before. Five known compounds have been isolated and identified by ^1H NMR spectroscopy and ^{13}C as well as high performance liquid chromatography paired to a UV detector and a mass spectrometer (HPLC-UV/MS): quercitrin (1), avicularine (2), afzelin (3), catechin (4) and epicatechin (5). All these compounds were biologically tested and they all proved their antioxidant properties with respective IC_{50} of $0.19 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, $0.19 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, $0.18 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ and $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$.

Introduction

Rhododendron groenlandicum, more commonly known as Labrador tea, is a shrub of the *Ericaceae* family, easily recognizable by its lower tomentose leaves. This plant is widely distributed in Quebec, Canada found in forests more precisely in damp places such as bogs, potholes and damp woods of conifers (Frère Marie-Victorin 1935). It was used by Native American for various treatments such as colds, asthma or even stomach aches. They also used root powder to apply it to ulcers as well as leaf powder to treat burns. Native Americans also used Labrador Tea infusion as a tonic, diuretic and to treat rheumatism (Chartier *et al.* 2005).

In a previous study, we reported the antioxidant and anti-inflammatory activities of *R. groenlandicum* leaves extracts. Some compounds have been isolated and identified including phenolic compounds as quercetin, catechin and triterpenes as uvaol, oleanolic acid and ursolic acid. Phenolic compounds have been found responsible of the antioxidant

activity as well as ursolic acid has been found responsible of the anti-inflammatory activity (Dufour 2006; Dufour *et al.* 2007).

In this study, we evaluated chemical composition and biological activity of flower extract of *R. groenlandicum*.

Material and methods

Chemicals

The solvents were purchased from Fisher Scientific.

Plant material and preparation of crude extract of flowers from *R. groenlandicum*

R. groenlandicum specimens were harvested in Chibougamau, Quebec, Canada. Flowers were separated from leaves and twigs and, dried at room temperature.

Low-pressure liquid chromatography (LPLC)

Low-pressure liquid chromatography was carried out on a Büchi Sepacore flash systems consisting of a control unit (C-620), two pump modules (C-605), a UV detector (C-635), and a fraction collector (C-660). Cartridge SiliaSepTM Flash Cartridges Silica were purchased from SiliCycle (Québec, Canada).

High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC-MS)

An Agilent 1100 Series system consisting of a column compartment (G1316A), an auto sampler (G1313A), isocratic pump with solvent cabinet (G1310A) equipped with a degasifier (G1322A, series 1200) and a multimode source (G1956B). The stationary phase was a C18 or a Kinetex Biphenyl 100 Å 250 x 4,6mm (5 µ).

Preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC prep)

A Shimadzu Prominence system consisting of a fractions collector (FRC-10A), a Diode Array Detector (DAD) (SPD-M20A), an auto sampler (SIL-10AP), two pumps (LC-20AP) equipped with a degasifier (DGU-20A 5R). The stationary phase was a C18 or a Kinetex Biphenyl 100 Å 250 x 21,2mm (5 µ).

TLC Plates

250 μm layer thickness SiliaPlateTM TLC Plates were purchased from SiliCycle (Québec, Canada). The TLC plates were sprayed with NP followed by PEG. TLC spots were visualized by inspection of the plate under UV 365 nm light and visible light.

Nuclear magnetic resonance (NMR)

A Bruker Avance 400 system for NMR¹H and NMR¹³C in 1D and 2D (DEPT, APT, COSY, HSQC, HMBC) analysis.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Cary 630 FTIR system from Agilent Technologies consisting of an attenuated Total Reflectance (ATR) module.

Isolation and identification of compounds

Powdered flowers (377.1 g) were extracted in MeOH/H₂O 1:1 maceration for 24h at room temperature. The same plant material was extracted 5 consecutive times with the same method. The crude hydroalcoholic extract were concentrated under vacuum and finally freeze-dried.

The flower extract was extracted with a liquid-liquid extraction of ethyl acetate and water. Then, the two extract were evaporated to dryness using a rotatory evaporator at 42°C to yield a water fraction (91.9 g) and an ethyl acetate fraction (32.6 g). Each of this fractions were tested for antioxidant (ORAC ; cell-based assay) and anti-inflammatory.

The ethyl acetate fraction was separate by chromatography on an open glass column packed with DIAION HP-20, with a step gradient of water and methanol as follow : water afforded fraction F1 (1.3 g), water and methanol 30 % afforded fraction F2 (2.6 g), methanol afforded fraction F3 (8.9 g) and ethyl acetate afforded fraction F4 (0.4 g).

Fraction F2 was separated by a LPLC on silica gel with CHCl₃:MeOH:H₂O (50:7:0.5 → 50:10:0.5 → 50:15:1 → 26:14:3, 2h) as the eluent followed by 100% MeOH. The resulting fractions were gathered according to their TLC profiles providing five fractions : F2.1 (74.0 mg), F2.2 (279.7 mg), F2.3 (80.1 mg), F2.4 (120.9 mg), F2.5 (201.0 mg), F2.6 (130.5 mg), F2.7 (135.9 mg), F2.8 (8.7 mg), F2.9 (129.5 mg), F2.10 (11.4 mg), F2.11 (45.3 mg) and F2.12 (5.5 mg). Fraction F2.2 was purified by preparative HPLC

(MeOH:H₂O + HCOOH 0.1%, 35:65 isocratic, in 10 minutes, biphenyl column) affording compound **4** (143.1 mg) and compound **5** (52.1 mg).

Fraction F3 was separated by an other DIAION column with this step gradient of water, methanol and ethyl acetate: water and methanol 30% afforded fraction F3.1 (1.2 g), water and methanol 35% and 40% afforded fraction F3.2 (0.6 g), methanol and ethyl acetate afforded F3.3 (1.8 g). Fraction F3.3 was separated by LPLC on silica gel with CHCl₃:MeOH (6% → 25% of MeOH, in 1h) as the eluent followed by methanol 100%. The resulting fractions were gathered according to their TLC profiles providing five fractions : F3.3.1 (137.9 mg), F3.3.2 (293.8 mg), F3.3.3 (584.0 mg) affording compound **1**, F3.3.4 (391.9 mg) and F3.3.5 (224.6 mg). Fraction F3.3.2 was purified LPLC on silica gel again with MeOH:H₂O + HCOOH 0.1% (30% → 80% of MeOH + 0.1% HCOOH, in 1h) as the eluent followed by MeOH 100%. The resulting fractions were gathered according to their TLC profiles providing four fractions : F3.3.2.1 (34.8 mg), F3.3.2.2 (103.8 mg), F3.3.2.3 (66.4 mg) and F3.3.2.4 (49.7 mg). Fraction F3.3.2.2 was purified by preparative HPLC (MeOH:H₂O + HCOOH 0.1%, 2:3 isocratic, in 40 min, C18 column) affording compound **2** (7.9 mg). Fraction F3.3.2.3 was purified by preparative HPLC with the same previous method affording compound **3** (4.2 mg).

NMR Characterization of isolated compounds

Quercitrin ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.34 (C-4), 164.79 (C-7), 161.84 (C-5), 158.14 (C-9), 157.14 (C-2), 149.00 (C-4'), 145.69 (C-3'), 134.86 (C-3), 122.04 (C-1'), 121.51 (C-6'), 116.37 (C-5'), 116.18 (C-2'), 104.78 (C-10), 102.34 (C-1''), 99.45 (C-6), 94.44 (C-8), 71.84 (C-4''), 71.27 (C-3''), 71.01 (C-2''), 70.71 (C-5''), 18.00. (C-6'')

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.54 (s, 1H – H-5), 7.27 (s, 1H – H-5'), 7.20 (s, 1H – H-1'), 6.86 (d, J = 8.1 Hz, 1H – H-2'), 6.35 (s, 1H – H-8), 6.15 (s, 1H – H-6), 5.22 (s, 1H – H-1''), 3.15 (s, 3H – H-4'', H-3''), 0.78 (s, 3H – H-6'').

Avicularin ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.68, (C-4) 164.71 (C-7), 161.22 (C-5), 156.91 (C-9), 156.40 (C-2), 148.61 (C-4'), 145.19 (C-3'), 133.34 (C-3), 121.69 (C-1'), 120.93 (C-6'), 115.61 (C-5'), 115.53 (C-2'), 107.82 (C-10), 103.80 (C-1''), 98.82 (C-6), 93.65 (C-8), 85.84 (C-4''), 82.14 (C-2''), 76.95 (C-3''), 60.63 (C-5'').

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.65 (s, 1H – H-5), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 1H – H-5'), 7.48 (s, 1H – H-1'), 6.85 (d, J = 7.7 Hz, 1H – H-2'), 6.41 (s, 1H – H-8), 6.20 (s, 1H – H-6), 5.58 (s, 1H – H-1''), 4.15 (s, 1H – H2'')

Afzelin ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2' – H-6'), 6.91 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3' – H-5'), 6.37 (s, 1H, H-8), 6.17 (s, 1H, H-6), 5.29 (s, 1H, H-1'), 0.78 (d, J = 5.8 Hz, CH₃).

Catechin ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.54 (C-7), 156.26 (C-5), 155.44 (C-9), 144.92 (C-3'), 144.92 (C-4'), 130.68 (C-1'), 118.52 (C-6'), 115.17 (C-5'), 114.59 (C-2'), 99.13 (C-10), 95.18 (C-6), 93.92 (C-8), 81.06 (C-2), 66.39 (C-3), 27.92 (C-4).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.79 – 6.65 (m, 1H, H-2', H-6'), 6.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 5.89 (s, 1H, H-8), 5.69 (s, 1H, H-6), 4.49 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-2), 3.82 (dd, J = 12.9, 6.9 Hz, 1H, H-3), 2.66 (dd, J = 16.0, 5.1 Hz, 1H, H-4), 2.36 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H, H-4).

Epicatechin ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.65 (C-5), 156.34 (C-7), 155.90 (C-9), 144.61 (C-3'), 144.55 (C-4'), 130.73 (C-1'), 118.07 (C-6'), 114.99 (C-2'), 114.87 (C-5'), 98.59 (C-10), 94.18 (C-8), 78.16 (C-2), 65.01 (C-3), 28.35 (C-4).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.90 (s, 1H – H-5'), 6.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H – H-2', H-6'), 5.90 (s, 1H – H-6), 5.72 (s, 1H – H-8), 4.74 (s, 1H – H-2), 3.17 (s, 1H – H-3), 2.69 (s, 1H – H-4), 2.47 (s, 1H – H-4).

Specific rotation and molecular weight

Table 1: Characterization of compounds

Compounds	Specific rotation	Molecular Weight on HPLC-MS (g/mol)
Quercitrin (1)	-140.0	448.2
Avicularin (2)	-65.6	434.2
Afzelin (3)	-77.4	432.1
Catechin (4)	(-)	290.1
Epicatechine (5)	(-)	290.1

Measurement of the antioxidant activity using ORAC and cell-based assays

ORAC assay

The procedure was modified from the method described by Ou *et al.* 2001. Briefly, the ORAC assay was carried out on a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems). Trolox was used as a control standard. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 30 s after addition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ($\mu\text{mol TE/mg}$).

Antioxidant cell-based assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)

Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by (Girard-lalancette *et al.* 2009), with some modifications. Briefly, L-929 cells were plated in 96 microwell plates at 10,000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were washed with 150 μl Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and incubated for 30 min with 100 μl HBSS (pH 7.4) containing 5 μM DCFH-DA (Sigma–Aldrich). The cells were then washed again with 150 μl HBSS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated either with a growing concentration of methanol extract from *R. groenlandicum*, trolox or quercetin, in the absence or presence of 200Mtert-butylhydroperoxide (tBH). Fluorescence was measured after 1h and 4h on the automated 96-well plate reader (Fluoroskan Ascent FLTM, Labsystems) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Results & Discussion

Extraction yield

The powder of dried flowers from *R. groenlandicum* was extracted by maceration using 50:50 MeOH:H₂O as described in Material and Methods. This solvent has been chosen because on the preliminary test it showed the best yield results. The extraction yield was

about 40 grams of crude extract by 100 grams of powder of dried flowers (40% w/w). Crude extract was fractionated to isolate and identify major constituents.

Isolation and identification of major constituent of crude extract of flowers from *R. groenlandicum*

Major constituents of hydromethanolic extract of *R. groenlandicum* flowers were isolated using several approaches as liquid-liquid extraction ; column chromatography ; LPLC and HPLC. The details of the isolation of each compound were previously described in Material and Methods. The structure of all isolated compounds was established on the basis of extensive spectroscopic analysis, including 1D and 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC), by comparison of their respective spectral data with those reported in the literature, by molecular weight and their specific rotations. The major compounds, presented in Figure 1, were identified as : quercitrin (1), avicularin (2), afzelin (3), catechin (4) and epicatechin (5).

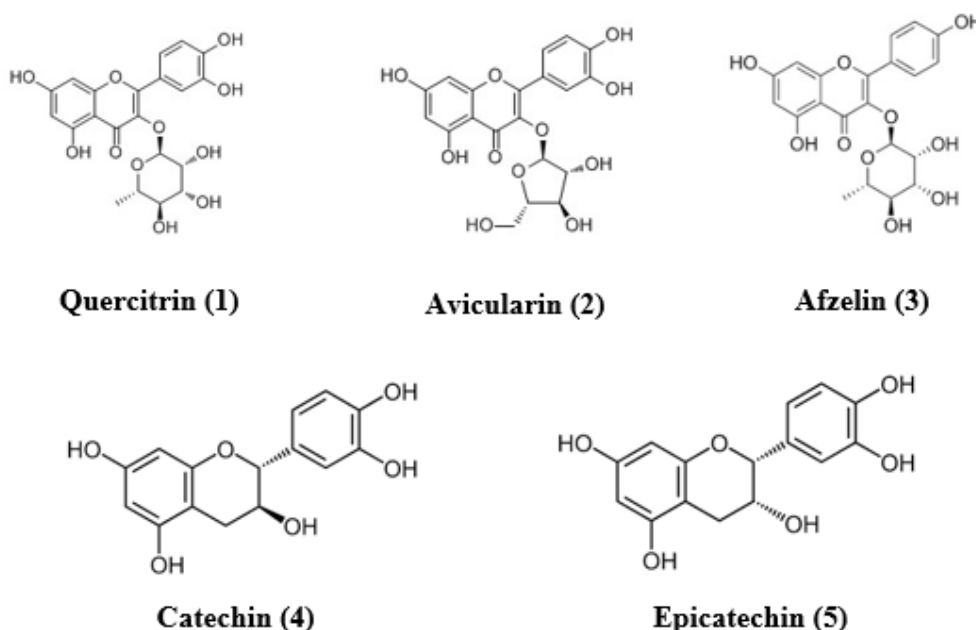


Figure 1: Molecular structures of isolated compounds from *R. groenlandicum*

Antioxidant activity of crude extract and isolated compounds

The antioxidant activity of hydromethanolic extract of *R. groenlandicum* was evaluated using ORAC and cell-based assays. The results are presented in Table 1. Trolox, quercetin and catechin were used as positive control. ORAC values are expressed as micromol

Trolox equivalent by milligram of extract while cell-based assay as expressed as the concentration ($\mu\text{g/ml}$) inhibiting fifty percent of DCFH oxidation (IC_{50}). The ORAC values of Trolox, quercetin and catechin are respectively of 5, 18 and 26 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ and their IC_{50} are respectively of 0.045, 0.034 and 0.053 $\mu\text{g/ml}$. The results presented in Table show that crude extract possess an interesting antioxidant activity with an ORAC value of 3.2 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ and an $\text{IC}_{50} < 0.2 \mu\text{g/ml}$. The ORAC value and IC_{50} of major constituents of extract was also determined in order to identify the compounds responsible of the antioxidant activity. The ORAC values presented in Table 1 show that all isolated compounds possess antioxidant activity with ORAC values ranging from 7.4 to 26 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ and IC_{50} ranging from 0.18 to 1.2 $\mu\text{g/ml}$. According both assays, quercitrin (1) and catechin (4) are the most active compounds with ORAC values respectively of 17.2 and 22 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ and IC_{50} of 0.19 and 0.18 $\mu\text{g/ml}$.

Table 2: Antioxidant activity of extract and isolated compounds

Compounds	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	Antioxidant cell-based assay ($\mu\text{g/ml}$)
Crude extract	3.2 \pm 0.2	< 0.2
Quercitrin (1)	17.2 \pm 0.92	0.19 \pm 0.05
Avicularin (2)	7.4 \pm 0.4	0.19 \pm 0.05
Afzelin (3)	24 \pm 2	1.2 \pm 0.2
Catechin (4)	22 \pm 3	0.18 \pm 0.05
Epicatechin (5)	10 \pm 3	0.4 \pm 0.1
Trolox standard	5 \pm 1	0.045 \pm 0.004
Quercetin standard	18 \pm 5	0.034 \pm 0.001
Catechin standard	26 \pm 1	0.053 \pm 0.007

In this study, we isolated five major constituents of hydromethanolic extract of flower from *R. groenlandicum* including quercitrin (1), avicularin (2), afzelin (3), catechin (4) et epicatechin (5). All of them are already reported in the literature and are known for their antioxidant properties. However, compounds 1, 2 and 3 have been isolated for the first time in *R. groenlandicum*. Quercitrin (1) is widespread in the nature. It has been isolated in a wide range of plants like in *Loranthaceae*, *Polygonum hydropiper* and *Muehlenbeckia tamnifolia* (Li *et al.* 2016; Torres-Naranjo *et al.* 2016). This compound is

already known for its antioxidant activity (Bose *et al.* 2013; Li *et al.* 2016; Torres-Naranjo *et al.* 2016) and anti-inflammatory activity (Medina *et al.* 2002; Camuesco *et al.* 2004; Comalada *et al.* 2005). Avicularin (**2**) has been isolated from many medicinal plants like *Lespedeza cuneata*, *Psidium guajava*, *Rhododendron schlipenbachii*, *Lindera erythocarpa* and also in *Allium Cepa*, *Picea abies* and *Hypericum idium* (Vo *et al.* 2012; May *et al.* 2015; Shabana *et al.* 2017). It has many biological activities: including anti-inflammatory, anti-infectious, anti-tumor, hepatoprotective, antioxidant and antiallergic (Vo *et al.* 2012). It shows an activity against the urease of *Canavalia ensiformis* (IC₅₀ of 140 µM) as well as those of *Lactobacillus fermentum* (48% inhibition at a concentration of 100 µM) (Shabana *et al.* 2017). It protects cardiomyocytes and hepatocytes against oxidative stress induced by apoptosis (Kim *et al.* 2011a, 2011b). It inhibits several effects induced by LPS such as overproduction of pro-inflammatory cytokines IL-1β and, degradation of IκBs that retain NF-κB in the cytoplasm (Vo *et al.* 2012). Afzelin (**3**) has already been isolated in other plants like the stem-bark of *Junglans mandshurica* (In *et al.* 2003), leaves of *Litsea japonica* (Lee *et al.* 2005) and leaves of *Cornus macrophylla* (Lee *et al.* 2014). It have shown an antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa* (MIC ≥31 µg/mL), and antitumor, anticomplement (IC₅₀ 250µM) and anti-apoptotic activities (Lee *et al.* 2005, 2014; Rho *et al.* 2011; Choe *et al.* 2012). A previous study demonstrated that afzelin blocks UVB-induced cell death in human keratinocytes by inhibiting intrinsic apoptotic signaling, the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and lipid peroxidation (Shin *et al.* 2013). Moreover, studies show that afzelin have an effect on melanogenesis by upregulating the expression of microphthalmia-associated transcription factor and by removal the expression of tyrosinase protein (Murata *et al.* 2014; Jung *et al.* 2016). Catechin (**4**) is widespread spread in the nature. It is know as a good antioxidant compound (Rice-Evans *et al.* 1996; Geetha *et al.* 2004; Iacopini *et al.* 2008). Studies demonstrated the anti-metastatic activity by inhibited lung tumour formation and the antimutagenic activity of catechin (Menon *et al.* 1999; Geetha *et al.* 2004). And finally epicatechin (**5**), which is a widespread spread in the nature compound too, is also already known for its antioxidant activity (Rice-Evans *et al.* 1996; Iacopini *et al.* 2008). Moreover, a study prove that this compound regulates GluR2 in cortical neurons and stimulates the response element activity of ERK-dependent cyclic adenosine monophosphate (Schroeter *et al.* 2007).

In conclusion, five compounds were isolated and characterized for the first time in flower extract from *R. groenlandicum*. All isolated compounds possess interesting antioxidant properties.

Acknowledgements

The author would like to thank Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for performing the biological assays. This work was supported by RDC-CRSNG.

References

- Bose S, Maji S et Chakraborty P. 2013. Quercitrin from *Ixora coccinea* Leaves and its Anti-oxidant Activity. *Journal of PharmaSciTech*, 2 : 72–74.
- Camuesco D, Comalada M, Rodri ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A et Ga J. 2004. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacologie*, 908–918.
- Chartier C, Staub H et Goetz P. 2005. Thé du Labrador (lédon du Groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). *Phytothérapie*, 3 : 84–87.
- Choe KI, Kwon JH, Park KH, Oh MH, Kim MH, Kim HH, Cho SH, Chung EK, Ha SY et Lee MW. 2012. The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. *Molecule*, 17 : 11484–11494.
- Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gulvez J et Zarzuelo A. 2005. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin , which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- j B pathway. *European Journal of Immunology*, 35 : 584–592.
- Dufour D. 2006. Évaluation de l'activité biologique du *Ledum groenlandicum* Retzius. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, 81 p.
- Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hébert ME, Lavoie S, Longtin A, Laprise C et Legault J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, 111 : 22–28.
- Frère Marie-Victorin. 1935. Flore Laurentienne. Montréal, 917 p.
- Geetha T, Garg A, Chopra K et Kaur IP. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin , epicatechin and green tea extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556 : 65–74.
- Girard-lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures : Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720–726.
- Iacopini P, Baldi M, Storchi P et Sebastiani L. 2008. *Journal of Food Composition and*

Analysis Catechin , epicatechin , quercetin , rutin and resveratrol in red grape : Content , *in vitro* antioxidant activity and interactions. Journal of Food Composition and Analysis, 21 : 589–598.

In BM, Ee SL, Im JK, Ee JL, Im TK et Im DK. 2003. Anti-complement Activity of Constituents from the Stem-Bark of *Juglans mandshurica*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26 : 1042–1044.

Jung E, Hee J, Ok M, Jang S, Kang M, Woong S, Hwa Y, Hyun S, Hee M, Park S et Lee J. 2016. Afzelin positively regulates melanogenesis through the p38 MAPK pathway. Chemico-Biological Interactions, 254 : 167–172.

Kim JA, Jung YS, Kim MY, Yang SY, Lee S et Kim YH. 2011a. Protective Effect of Components Isolated from *Lindera erythrocarpa* against Oxidative Stress - induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyocytes. Phytotherapy Research, 1617 : 1612–1617.

Kim SM, Kang K, Jho EH, Jung YJ et Nho CW. 2011b. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert - Butyl Hydroperoxide. Phytotherapy Research, 25 : 1011–1017.

Lee S, Min B, Kim J, Lee J, Kim T, Kim C, Kim Y et Lee H. 2005. Flavonoids from the Leaves of *Litsea japonica* and Their Anti-complement Activity. Phytotherapy Research, 19 : 273–276.

Lee SY, So Y, Shin MS, Cho JY et Lee J. 2014. Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals. Molecules, 19 : 3173–3180.

Li X, Jiang Q, Wang T, Liu J et Chen D. 2016. Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin : Understanding the Role of the 6"-OH Group. Molecules, 21 : 1246.

May O, Radusiene J, Sciences H et Sciences H. 2015. Population Variability of Main Secondary Metabolites in *Hypericum lydiium* Boiss . (Hypericaceae). Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 14 : 969–978.

Medina D, Vera B, Ga J, Zarzuelo A et Sa F. 2002. Effect of quercitrin on the early stages of haptén induced colonic inflammation in the rat. Life Sciences, 70 : 3097–3108.

Menon LG, Kuttan R et Kuttan G. 1999. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. Cancer Letters, 141 : 159–165.

Murata K, Takahashi K, Nakamura H, Itoh K et Matsuda H. 2014. Search for skin-whitening agent from Prunus plants and the molecular targets in melanogenesis pathway of active compounds. Natural Product Communications, 9 : 185–188.

Ou B, Hampsch-woodill M, Prior RL, Laboratories B et Lane T. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49 : 4619–4626.

Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, Cho DH et Cho JY. 2011. Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. Molecules, 16 : 3338–3344.

Rice-Evans CA, Miller NJ et Paganga G. 1996. Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 : 933–956.

Schroeter H, Bahia P, Spencer JPE, Sheppard O, Rattray M, Cadenas E, Rice-evans C et Williams RJ. 2007. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 101 : 1596–1606.

Shabana S, Kawai A, Kai K, Akiyama K et Hayashi H. 2017. Inhibitory Activity against Urease of Quercetin Glycosides Isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*. *Organic Chemistry Notes*, 74 : 878–880.

Shin SW, Jung E, Kim S, Kim J, Kim E, Lee J et Park D. 2013. Antagonizing Effects and Mechanisms of Afzelin against UVB-Induced Cell Damage. *PLoS ONE*, 8 .

Torres-Naranjo M, Suárez A, Gilardoni G, Cartuche L, Flores P et Morocho V. 2016. Chemical Constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its *In Vitro* α -Amilase and α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21 : 1461.

Vo VA, Lee J, Chang J, Kim J, Kim N, Lee HJ, Kim S, Chun W et Kwon Y. 2012. Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264 . 7 Macrophages. *Biomolecules & Therapeutics*, 20 : 532–537.

CHAPITRE IV

COMPARAISON DES HUILES ESSENTIELLES DE FLEURS ET DE FEUILLES DE *RHODODENDRON* *GROENLANDICUM*

Ce chapitre présente un article scientifique sur la comparaison de l'huile essentielle de feuilles et de fleurs de *R. groenlandicum*. L'article intégral est précédé d'un résumé en français.

Résumé

L'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Rhododendron groenlandicum* a été rapportée dans la littérature par Belleau et Collin en 1993. Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *R. groenlandicum* a été rapportée partiellement (Belleau et Collin 1993). Dans le cadre de ce travail, nous avons analysé et comparé la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles et de fleurs de *R. groenlandicum*. Les huiles obtenues par hydrodistillation ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et par ionisation par flamme (GC-FID) afin de déterminer leurs compositions chimiques ainsi que la concentration relative des composés présents. Cette étude a révélé que la composition des deux huiles essentielles était différente, au niveau des composés présents et de leurs proportions, tandis que les composés majoritaires de l'huile essentielle de fleurs sont le germacrene B (18,65%), l' α -selinene (18,53%) et le β -selinene (9,03%), ceux des feuilles sont l' α -selinene (13,99%), le germacrene B (13,20%) et l' α -pinene (8,59%). D'autre part, l'activité biologique des deux huiles essentielles a été évaluée notamment les activités antioxydante et anti-inflammatoire. Les deux huiles essentielles possèdent des propriétés anti-inflammatoires avec des IC₅₀ respectives de 23 ± 4 et 34 ± 8 µg/mL pour les fleurs et les feuilles. L'activité antioxydante, quant à elle, est similaire pour les 2 huiles avec une IC₅₀ de 0,0018 ± 0,0003 µg/mL.

Comparison of essential oils from flowers and leaves of *Rhododendron groenlandicum*

Marion Etienne, François Simard, André Pichette, Jean Legault

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555, Boulevard de l'Université,

Chicoutimi, Québec, Canada G7H 2B1

Abstract

The analysis of the essential oil of the leaves of *Rhododendron groenlandicum* was reported in the literature by Belleau and Collin in 1993. However, the chemical composition of the essential oil of *R. groenlandicum* flowers has been partially reported (Belleau and Collin 1993). As part of this work, we analyzed and compared the chemical composition of the essential leaf's oil and *R. groenlandicum* flowers. The oils obtained by hydrodistillation were analyzed by gas chromatography paired to a mass spectrometer (GC-MS) and by flame ionization (GC-FID) in order to determine their chemical compositions as well as the relative concentration of the compounds present. This study revealed that the composition of the two essential oils was different at the level of the present compounds and their proportions, as the essential compounds of the essential oil of flowers are germacrene B (18.65%), α -selinene (18.53%) and β -selinene (9.03%), those of the leaves are α -selinene (13.99%), germacrene B (13.20%) and α -pinene (8.59%). On the other hand, the biological activity of the two essential oils has been evaluated including antioxidant and anti-inflammatory activities. Both essential oils have anti-inflammatory activity with IC_{50} respectively of 23 ± 4 and 34 ± 8 $\mu\text{g/mL}$ for flower and leaves. The antioxidant activity, for its part, is similar for both oils with an IC_{50} of 0.0018 ± 0.0003 $\mu\text{g/mL}$.

Introduction

Rhododendron groenlandicum is a plant which belongs to the *Ericaceae* family (Frère Marie-Victorin 1935). More commonly known as Labrador tea, this plant was used by Native Americans for various treatments such as to treat rheumatism, burns, inflammations and a lot of other diseases (Holmes 1884; Densmore 1928; Chartier *et al.* 2005).

Essentials oils are known for their virtues all over the world. Many of books and articles are already teaching their uses and activities. Studies have already been carried out on *R. groenlandicum* essentials oils. A large number compounds, such as α -pinene or camphene, have been detected. However, essentials oils from flowers and leaves have been studying separately once by Belleau et Collin (1993) They found that the major compounds of the leaves oil were sabinene (16-17%), terpinen-4-ol (7,6%), β -selinene (5,7%) and myrtenal (3,5%) and limonene (24.2%), an unknow compound (10.5%) and sabinene (8.9%) for the flowers oil. However, the analysis was not complete.

In this study, we analysed and compared chemical composition of essential oil of flower and leave from *R. groenlandicum*. We also evaluated anti-oxidant and anti-inflammatory activities using cell-based assays.

Material and methods

Chemicals

The solvents were purchased from Fisher Scientific.

Plant material

All *R. groenlandicum* specimens were harvested in a forest near Ferland-et-Boileau, Quebec (48°07'13.1"N 70°50'11.8"W), Canada, on the 22th of June in 2016.

Distillation of essentials oils

The first essential oil was obtained from freshly harvested flowers (630.2g) and the second ones was obtained from freshly harvested leaves (599.3g) by hydrodistillation for 3 hours. At the end, all of the essential oil and hydrolat were collected. The yield of extration was 0.0004% for the flowers essential oil and 3.7% for the leaves one. The both obtain oils were pale green.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis

The essentials oils were analyzed by GC on a Hewlett-Packard 7890A (FID detector) gas chromatography equipped with HP-5MS column (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). GC-MS analyses were performed on a Hewlett-Packard 7890A equipped with a Agilent column 19091S-433 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). The temperature program was 60°C for 2min, then an increase of 3°C/min to 250°C, then increased 15°C/min to 280°C and keep this

temperature during 5 minutes. Identification of the volatile constituents was made on the basis of their retention indices and their mass spectra, which were compared with literature data (Belleau 1990).

Measurement of the antioxidant activity using antioxidant cell-based assay 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)

Antioxidant activity was evaluated using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate probe (DCFH-DA) as described by (Girard-lalancette *et al.* 2009) with some modifications. Briefly, L-929 cells were plated in 96 microwell plates at 10,000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were washed with 150 µl Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and incubated for 30 min with 100 µl HBSS (pH 7.4) containing 5 µM DCFH-DA (Sigma–Aldrich). The cells were then washed again with 150 µl HBSS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated either with a growing concentration of essential oils from *R. groenlandicum*, trolox or quercetin, in the absence or presence of 200 mM tert-butylhydroperoxide (tBH). Fluorescence was measured after 1 hour and 4 hours on the automated 96-well plate reader (Fluoroskan Ascent FLTM, Labsystems) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification

Exponentially growing cells were plated in 24-well microplates (BD Falcon) at a density of 2×10⁵ cells per well in 400 µl of culture medium and were allowed to adhere overnight. Cells were then treated or not with positive control N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), or increasing concentrations of essential oil dissolved in the appropriate solvents, and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 hours. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cells were then stimulated with 100 µg/ml lipopolysaccharide (LPS). After 24 hours, cell-free supernatants were collected and stored at –80 °C until NO determination using the Griess reaction (Green *et al.* 1990) with minor modifications. Briefly, 100 µl aliquots of cell supernatants were incubated with 50 µl of 1% sulfanilamide and 50 µl of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄ at room temperature for 20 minutes. Absorbance at 540 nm was then measured using an automated 96-well Varioskan Ascent plate reader (Thermo Electron) and the presence of nitrite was quantified by comparison with an NaNO₂ standard curve.

Results and discussion

Chemical composition of the essential oils

The essential oils of flowers and leaves of *R. groenlandicum* were prepared using hydrodistillation and were analyzed by gaseous chromatography as described in Material and Methods. The results are presented in Table 1 as well as in Figure 1 and 2. The main components of the leaves essential oil were α -selinene, germacrene B and α -pinene with relative concentration of 13,99%, 13,20% and 8,59%. In contrast, Belleau and Collin (1993) reported that the major compounds of the leaves essential oil were sabinene (16-17%), terpinen-4-ol (7,6%), β -selinene (5,7%) and myrtenal (3,5%) suggesting different chemotypes for *R. groenlandicum*. This could be also explained by the difference of harvest season, the location and also the weather during the whole year (Belleau 1990).

In the other hand, the main components of the flowers essential oil were germacrene B and α -selinene with relative concentration of 18,65% and 18,53% as observed for leaves essential oil. An other major compound in flowers oil was β -selinene with a relative concentration of 9,03%. In contrast, Belleau and Collin (1993) found that the major compounds of flowers essential oil were limonene (24.2%), an unknown compound (10.5%) and sabinene (8.9%).

The comparison of flowers and leaves essential oil show that some compounds are present only in leaves essential oil such as limonene (9.80%), camphene (0.53%), γ -terpinene (0.85%), pinocarveol-trans (0.35%), pinocarvone (0.32%), terpinene-4-ol (0.21%), myrtenal (0.33%) and delta-cadiene (0.93%), while β -bourbonene (0.16%), alloaromadendrene (1.03%) and germacrone (4,49%) are present only in flowers oil.

Table 1: Composition of the essentials oils of flowers and leaves from *R. groenlandicum*

Compounds	RI	Flowers	Leaves
α -pinene	935	0.70	8.59
Camphene	950	(-)	0.53
Sabinene	974	1.33	4.29
β -pinene	978	1.25	3.81

Myrcene	991	1.18	0.46
Limonene	1031	(-)	9.80
γ -terpinene	1060	(-)	0.85
Pinocarveol-trans	1140	(-)	0.35
Pinocarvone	1164	(-)	0.32
Terpinene-4-ol	1179	(-)	0.21
Myrtenal	1198	(-)	0.33
Bornyl acetate	1288	0.61	1.15
Delta elemene	1340	0.26	0.28
α -copaene	1379	0.17	0.37
β -bourbonene	1388	0.16	(-)
β -elemene	1395	1.90	1.31
α -gurjunene	1413	0.51	0.46
β -caryophyllene	1423	0.96	0.91
γ -elemene	1436	0.47	0.28
α -humulene	1458	4.45	3.92
Allo-aromadendrene	1465	1.03	(-)
Germacrene D	1485	3.35	3.26
β -selinene	1491	9.03	6.47
α -selinene	1500	18.53	13.99
Germacrene A	1510	2.94	2.69
Delta-cadiene	1527	(-)	0.93
Germacrene B	1564	18.65	13.20
Germacrone	1701	4.49	(-)

71.97% of the flowers essential oil were identified, and 78.76% for the leaves one.

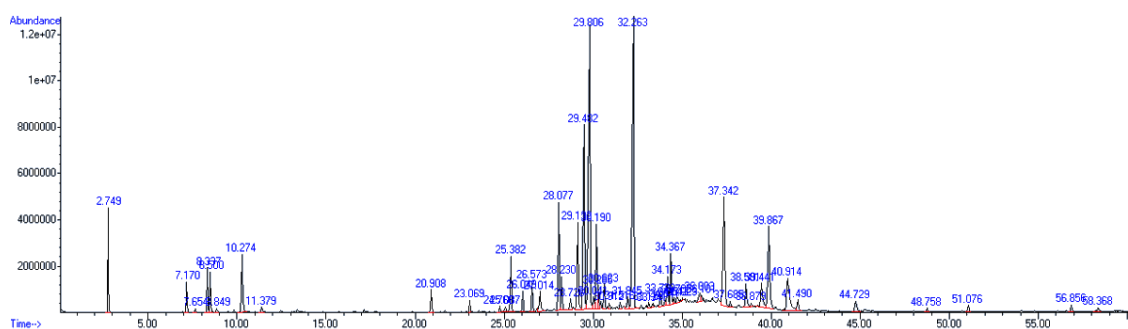


Figure 1: Flowers essential oil GC-MS chromatogram

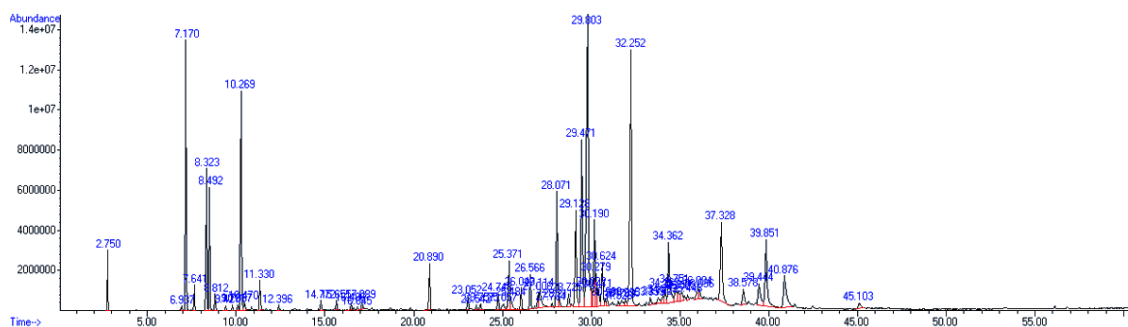


Figure 2: Leaves essential oil GC-MS chromatogram

Antioxidant and anti-inflammatory activities of *R. groenlandicum* essentials oils from flowers and leaves

Anti-oxidant activity of essential oils of flowers and leaves from *R. groenlandicum* were evaluated using cell-based assays as described in Material and Methods. The results of cell-based assay are expressed as the concentration inhibiting fifty percent of DCFH oxidation (IC_{50}). Quercetin was used as positive control with IC_{50} value of $0.154 \pm 0,005$ $\mu\text{g/ml}$. The results presented in Table 2 show that flowers and leaves essential oils possess similar antioxidant activities with IC_{50} of 0.0018 $\mu\text{g/ml}$. Anti-inflammatory activity was also evaluated using nitric oxide (NO) inhibition assay using Raw264.7 macrophage LPS-stimulated. The results are expressed as concentration inhibiting fifty percent of NO overproduction induced by LPS in Raw264.7 macrophages (IC_{50}). The results presented in Table 2 show that flowers and leaves essential oils inhibit overproduction of NO with IC_{50} of 23 ± 4 and 34 ± 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Table 2: Antioxidant and anti-inflammatory activities of *R. groenlandicum* essential oils using cell-based assays.

	Essential Oil	IC₅₀ (µg/mL)
Anti-inflammatory activity	Flowers	23 ± 4
	Leaves	34 ± 8
Antioxidant activity	Flowers	0,0018 ± 0,0003
	Leaves	0,0018 ± 0,0004

In conclusion, this study reports the chemical composition and biological activity of flowers and leaves essential oils of *R. groenlandicum*. The main compounds of both essential oils are α -selinene and germacrene B. However, some compounds are found only in flowers or in leaves essential oils. Finally, both essential oils possess antioxidant and anti-inflammatory properties.

Acknowledgements

The authors would like to thank Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for performing the biological assays. This work was supported by RDC-CRSNG.

References

- Belleau F. 1990. Analyse de l'huile essentielle du *Ledum groenlandicum*, Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi. 153 p.
- Belleau F et Collin GUY. 1993. COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF *LEDUM GROENLANDICUM*. *Phytochemistry*, 33 : 117–121.
- Chartier C, Staub H et Goetz P. 2005. Thé du Labrador (lédon du Groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). *Phytothérapie*, 3 : 84–87.
- Densmore F. 1928. Uses of Plants by the Chippewa Indians. SI-BAE Annual Report, 44 : 352.
- Frère Marie-Victorin. 1935. Flore Laurentienne. Montréal, 917 p.
- Girard-lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures : Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720–726.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs J et Nancy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*, 144 : 278–283.

Holmes EM. 1884. Medicinal Plants Used by Cree Indians, Hudson's Bay Territory. *The Pharmaceutical Journal and Transactions*, 15 : 303.

CONCLUSION

L'objectif principal du projet, qui était d'isoler des composés dans les fleurs de *R. groenlandicum*, a été atteint. Des travaux de purification ont été entrepris et ont permis d'isoler et de caractériser cinq composés dans les fleurs incluant la quercitrin (1), l'avicularine (2) l'afzeline (3), la catéchine (4) et l'épicatéchine (5). Les résultats ont aussi permis de détecter la présence de deux familles de composés, à savoir les composés phénoliques et les flavonoïdes.

Parmi les cinq composés identifiés dans les fleurs, deux sont très largement retrouvés dans les plantes : la catéchine (4) et l'épicatéchine (5). Les trois autres composés, la quercitrin (1), l'avicularine (2) et l'afzeline (3), en plus d'être plus rares, n'ont jamais été identifiés dans le *R. groenlandicum*. Ce sont également tous les trois des glycosides de flavonoïdes (glycosides de kaempferol et de quercétine), composés qui n'ont pas été trouvés dans les feuilles. Ils sont reconnus pour leur activités antioxydantes ce que nous avons validé à nouveau dans le cadre de ce projet. D'autres activités, telles que l'activité anti-inflammatoire et l'activité cytotoxique, ont été testées mais ces composés se sont avérés inactifs.

Ce projet a donc permis d'améliorer nos connaissances sur les fleurs de *R. groenlandicum* au niveau de la composition chimique et de l'activité biologique. Les composés isolés lors des différentes étapes de purification expliquent en partie l'activité biologique des extraits par macération. Les composés phénoliques et autres flavonoïdes pourraient également expliquer cette activité. Les isoler serait un bon moyen de le vérifier.

L'objectif secondaire était de comparer l'huile essentielle des fleurs et avec l'huile essentielle des feuilles de thé du Labrador, au niveau de leurs composition chimique. L'étude a montré que les deux huiles ont des composés majoritaires similaires. Cependant, plusieurs composés minoritaires présents dans l'huile essentielle de feuilles sont absents des fleurs et vice versa. Il est intéressant de mentionner que la composition chimique de l'huile essentielle de cette étude est différente de celle rapportée dans la littérature ce qui suggère l'existence d'un nouveau chémotype. Finalement, leurs activités biologiques ont été testées. Les deux huiles se sont révélées antioxydantes et anti-inflammatoires. Cette étude a permis d'en apprendre plus sur l'huile essentielle de *R. groenlandicum*, notamment sur celle des fleurs qui avait été étudiée de manière partielle.

Bibliographie

- Beardsley G. 1941. Notes on Cree Medicines, Based on Collections Made by I. Cowie in 1892. Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters, 28 : 492.
- Belleau F. 1990. Analyse de l'huile essentielle du *Ledum groenlandicum*, Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi. 153 p.
- Belleau F et Collin GUY. 1993. Composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*. Phytochemistry, 33 : 117–121.
- Black MJ. 1980. Algonquin Ethnobotany: An Interpretation of Aboriginal Adaptation in South Western Quebec, Ottawa. National Museums of Canada. Mercury Series, 65 : 127.
- Bose S, Maji S et Chakraborty P. 2013. Quercitrin from *Ixora coccinea* Leaves and its Anti-oxidant Activity. Journal of PharmaSciTech, 2 : 72–74.
- Burgesse JA. 1944. The Woman and the Child Among the Lac-St.-Jean Montagnais. Primitive Man, 17 : 14.
- Camuesco D, Comalada M, Rodri ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A et Ga J. 2004. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. British Journal of Pharmacologie, 908–918.
- Chandler RF, Freeman L et Hooper SN. 1979. Herbal Remedies of the Maritime Indians. Journal of Ethnopharmacology, 1 : 58.
- Chartier C, Staub H et Goetz P. 2005. Thé du Labrador (lédon du Groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). Phytothérapie, 3 : 84–87.
- Choe KI, Kwon JH, Park KH, Oh MH, Kim MH, Kim HH, Cho SH, Chung EK, Ha SY et Lee MW. 2012. The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. Molecule, 17 : 11484–11494.
- Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gulvez J et Zarzuelo A. 2005. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin , which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- j B pathway. European Journal of Immunology, 35 : 584–592.

- Compton BD. 1993. Upper North Wakashan and Southern Tsimshian Ethnobotany: The Knowledge and Usage of Plants, Ph.D. Dissertation, University of British Columbia. 241 p.
- Densmore F. 1928. Uses of Plants by the Chippewa Indians. SI-BAE Annual Report, 44 : 352.
- Dufour D. 2006. Évaluation de l'activité biologique du *Ledum groenlandicum* Retzius. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, 81 p.
- Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hébert ME, Lavoie S, Longtin A, Laprise C et Legault J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. Journal of Ethnopharmacology, 111 : 22–28.
- Frère Marie-Victorin. 1935. Flore Laurentienne. Montréal, 917 p.
- Geetha T, Garg A, Chopra K et Kaur IP. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin , epicatechin and green tea extract. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 556 : 65–74.
- Gill SJ. 1983. Ethnobotany of the Makah and Ozette People, Olympic Peninsula, Washington (USA), Ph.D. Thesis Washington State University. 301 p.
- Girard-lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures : Analysis of fruit and vegetable juices. Food Chemistry, 115 : 720–726.
- Giraud-Robert A-M. 2005. Intérêt de l'aromathérapie dans la prise en charge des hépatites virales. Phytothérapie, 3 : 235–247.
- Goetz P. 2005. Plantes médicinales d'Amérique du Nord: Apport à la phytothérapie française du traitement des affections des voies respiratoires. Phytothérapie, 3 : 19–27.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs J et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. The Journal of Immunology, 144 : 278–283.
- Gunther E. 1973. Ethnobotany of Western Washington, Seattle. University of

Washington Press Revised edition, 43.

Harmaja H. 1991. Taxonomic notes on *Rhododendron* subsection *Ledum* (*Ledum*, Ericaceae), with a key to its species. *Annales Botanici Fennici*, 28 : 171–173.

Hébert F et Thiffault N. 2011. The Biology of Canadian Weeds. 146. *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron and Judd. *Canadian Journal of Plant Science*, 91 : 725–738.

Holmes EM. 1884. Medicinal Plants Used by Cree Indians, Hudson's Bay Territory. *The Pharmaceutical Journal and Transactions*, 15 : 303.

Iacopini P, Baldi M, Storchi P et Sebastiani L. 2008. Journal of Food Composition and Analysis Catechin , epicatechin , quercetin , rutin and resveratrol in red grape : Content , *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 : 589–598.

In BM, Ee SL, Im JK, Ee JL, Im TK et Im DK. 2003. Anti-complement Activity of Constituents from the Stem-Bark of *Juglans mandshurica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26 : 1042–1044.

Judd, Walter S et Kron KA. 2009. *Rhododendron Linnaeus*, Sp. Pl. 1: 392. 1753; Gen. Pl. ed. 5, 185. 1754. *Flora of North America*, 8 : 455.

Jung E, Hee J, Ok M, Jang S, Kang M, Woong S, Hwa Y, Hyun S, Hee M, Park S et Lee J. 2016. Afzelin positively regulates melanogenesis through the p38 MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 254 : 167–172.

Kim JA, Jung YS, Kim MY, Yang SY, Lee S et Kim YH. 2011a. Protective Effect of Components Isolated from *Lindera erythrocarpa* against Oxidative Stress - induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyocytes. *Phytotherapy Research*, 1617 : 1612–1617.

Kim SM, Kang K, Jho EH, Jung YJ et Nho CW. 2011b. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert - Butyl Hydroperoxide. *Phytotherapy Research*, 25 : 1011–1017.

Lee S, Min B, Kim J, Lee J, Kim T, Kim C, Kim Y et Lee H. 2005. Flavonoids from the Leaves of *Litsea japonica* and Their Anti-complement Activity. *Phytotherapy Research*, 19 : 273–276.

- Lee SY, So Y, Shin MS, Cho JY et Lee J. 2014. Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals. *Molecules*, 19 : 3173–3180.
- Leighron AL. 1985. Wild Plant Use by the Woods Cree (Nihithawak) of East-Central Saskatchewan, Ottawa. 145 p.
- Li X, Jiang Q, Wang T, Liu J et Chen D. 2016. Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin : Understanding the Role of the 6"-OH Group. *Molecules*, 21 : 1246.
- May O, Radusiene J, Sciences H et Sciences H. 2015. Population Variability of Main Secondary Metabolites in *Hypericum lydiium* Boiss . (Hypericaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14 : 969–978.
- Medina D, Vera B, Ga J, Zarzuelo A et Sa F. 2002. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences*, 70 : 3097–3108.
- Menon LG, Kuttan R et Kuttan G. 1999. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Letters*, 141 : 159–165.
- Moerman DE. 1998. Native American Ethnobotany. Portland, 927 p.
- Murata K, Takahashi K, Nakamura H, Itoh K et Matsuda H. 2014. Search for skin-whitening agent from Prunus plants and the molecular targets in melanogenesis pathway of active compounds. *Natural Product Communications*, 9 : 185–188.
- Ou B, Hampsch-woodill M, Prior RL, Laboratories B et Lane T. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49 : 4619–4626.
- Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, Cho DH et Cho JY. 2011. Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, 16 : 3338–3344.
- Rice-Evans CA, Miller NJ et Paganga G. 1996. Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 : 933–956.

- Rousseau J. 1946. Notes Sur L'ethnobotanique D'anticosti. Archives de Folklore, 1 : 63.
- Schroeter H, Bahia P, Spencer JPE, Sheppard O, Rattray M, Cadenas E, Rice-evans C et Williams RJ. 2007. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. Journal of Neurochemistry, 101 : 1596–1606.
- Shabana S, Kawai A, Kai K, Akiyama K et Hayashi H. 2017. Inhibitory Activity against Urease of Quercetin Glycosides Isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*. Organic Chemistry Notes, 74 : 878–880.
- Shin SW, Jung E, Kim S, Kim J, Kim E, Lee J et Park D. 2013. Antagonizing Effects and Mechanisms of Afzelin against UVB-Induced Cell Damage. PLoS ONE, 8 .
- Smith H. 1929. Materia Medica of the Bella Coola and Neighboring Tribes of British Columbia. National Museum of Canada Bulletin, 56 : 63.
- Speck FG. 1917. Medicine Practices of the Northeastern Algonquians. Dans : 19th International Congress of Americanists. p. 317.
- Tam TW, Liu R, Arnason JT, Krantis A, Staines WA, Haddad PS et Foster BC. 2009. Actions of ethnobotanically selected Cree anti-diabetic plants on human cytochrome P450 isoforms and flavin-containing monooxygenase 3. 126 : 119–126.
- Torres-Naranjo M, Suárez A, Gilardoni G, Cartuche L, Flores P et Morocho V. 2016. Chemical Constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its *In Vitro* α -Amilase and α -Glucosidase Inhibitory Activities. Molecules, 21 : 1461.
- Turner NC et Bell MA. 1973. The Ethnobotany of the Southern Kwakiutl Indians of British Columbia. Economic Botany, 27 : 283.
- Turner NJ, Thomas J, Carlson BF et Ogilvie RT. 1983. Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island, Victoria. 106 p.
- Vo VA, Lee J, Chang J, Kim J, Kim N, Lee HJ, Kim S, Chun W et Kwon Y. 2012. Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264 . 7 Macrophages. Biomolecules & Therapeutics, 20 : 532–537.

ANNEXES

Clicours.COM

ANNEXE 1 : Spectre RMN des composés isolés dans les fleurs de *R. groenlandicum*

Cette annexe regroupe les spectres protons (^1H) et carbone (^{13}C) des composés isolés dans les fleurs de *R. groenlandicum*. Une exception est faite pour l'afzelin, le spectre ^{13}C n'ayant rien donné, un spectre DEPT135 le remplace dans cette annexe.

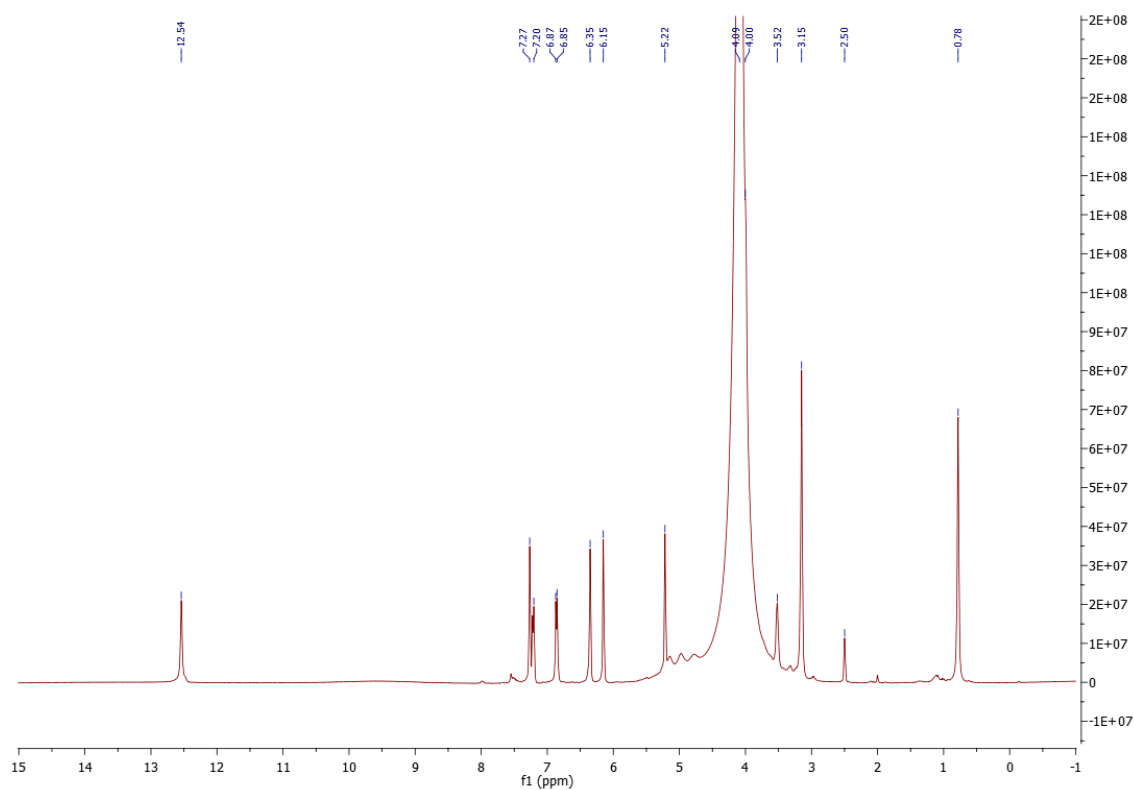


Figure 3 : Spectre ^1H de la Quercitrine

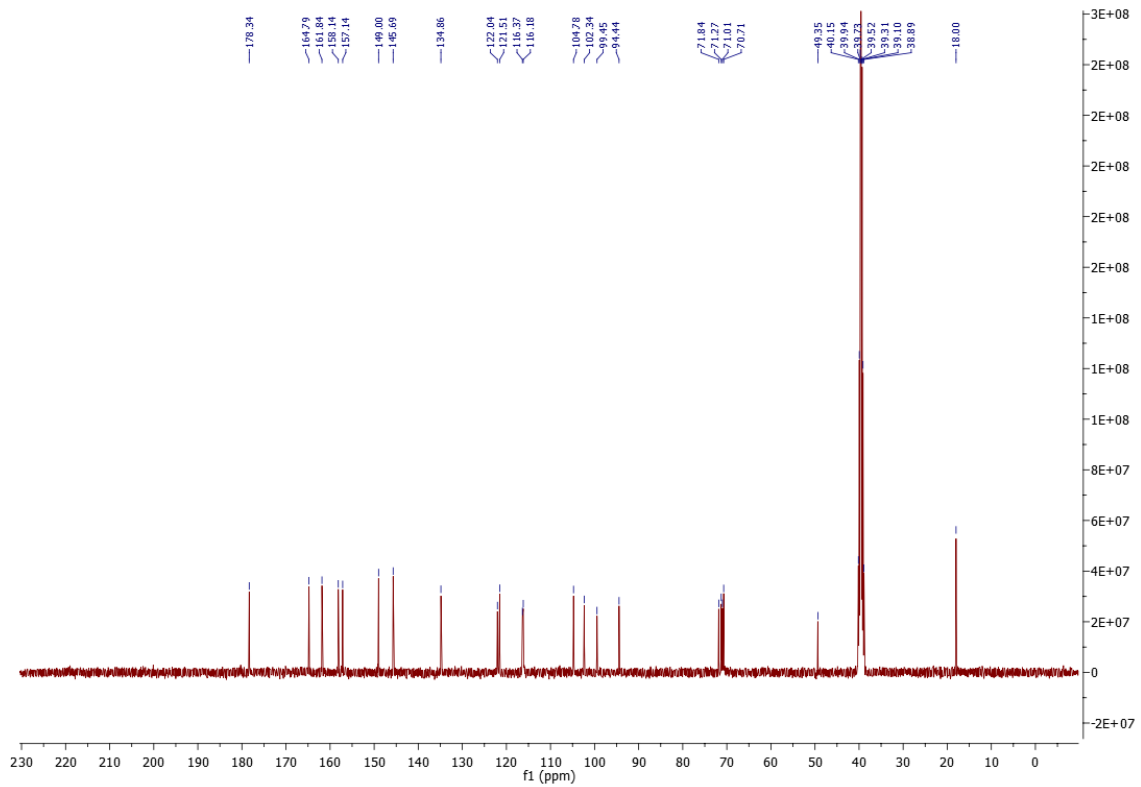


Figure 4 : Spectre ^{13}C de la quercitrine

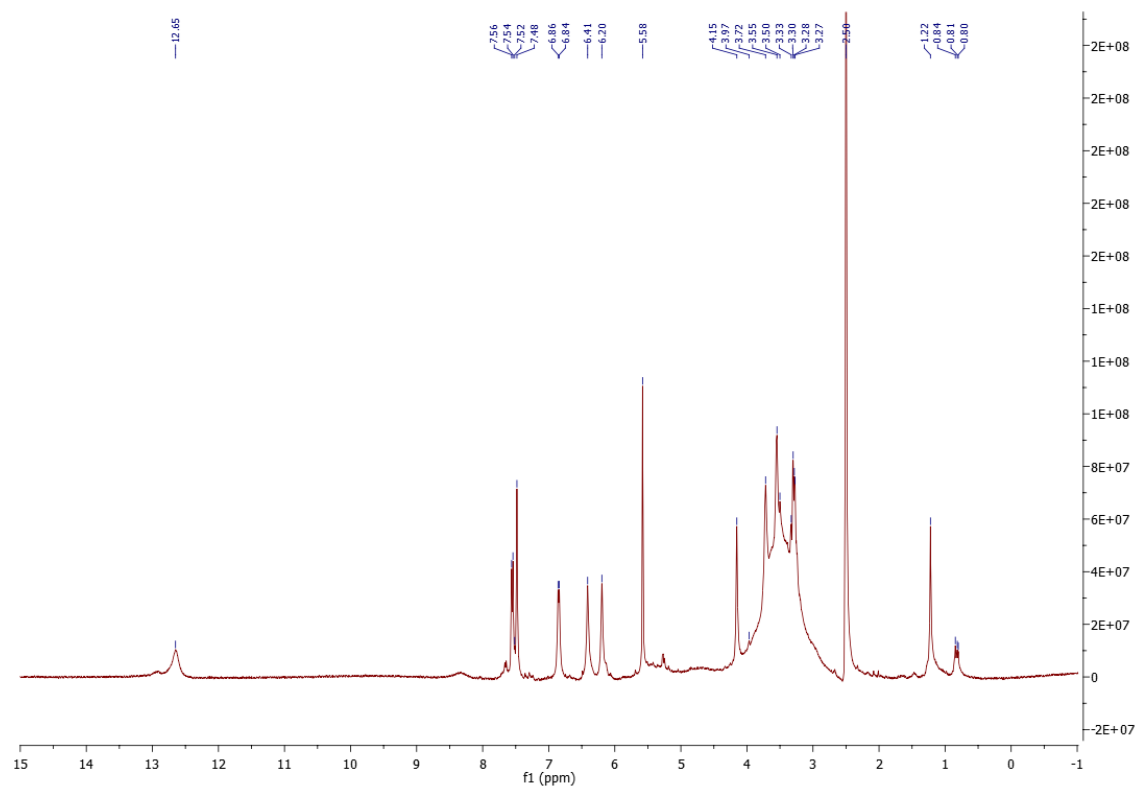


Figure 5 : Spectre ^1H de l'avicularin

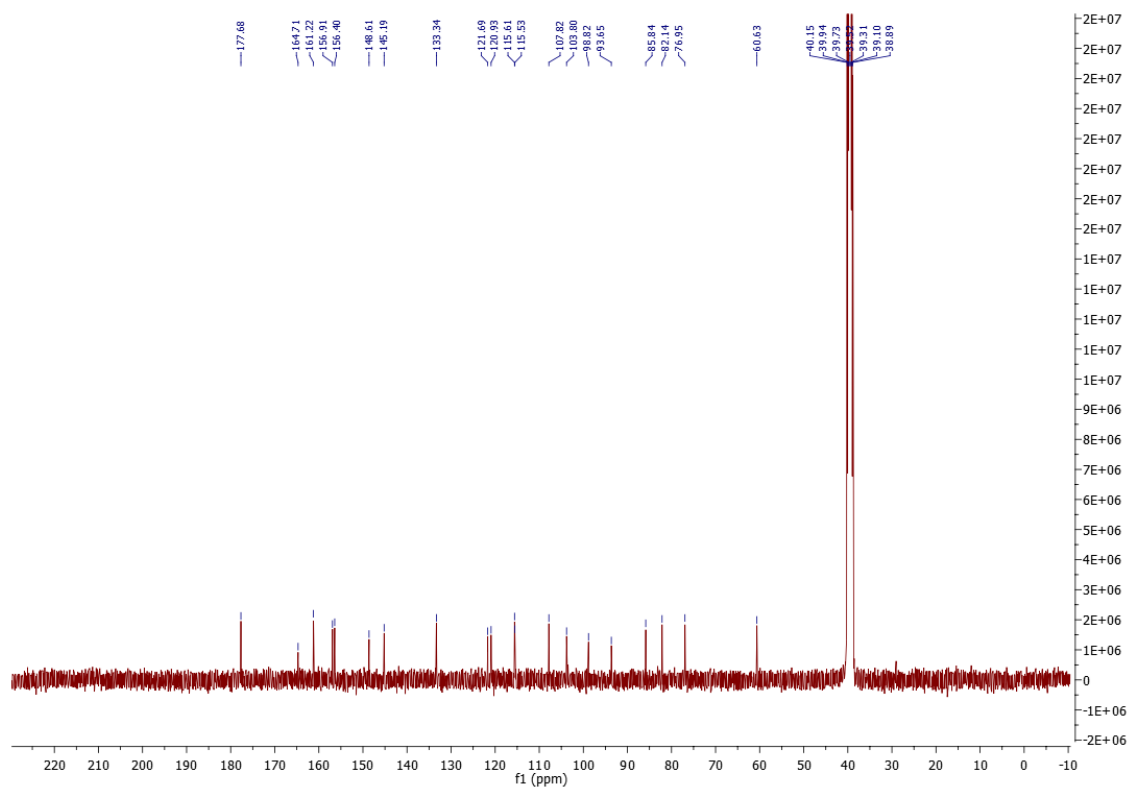


Figure 6 : Spectre ^{13}C de l'avicularin

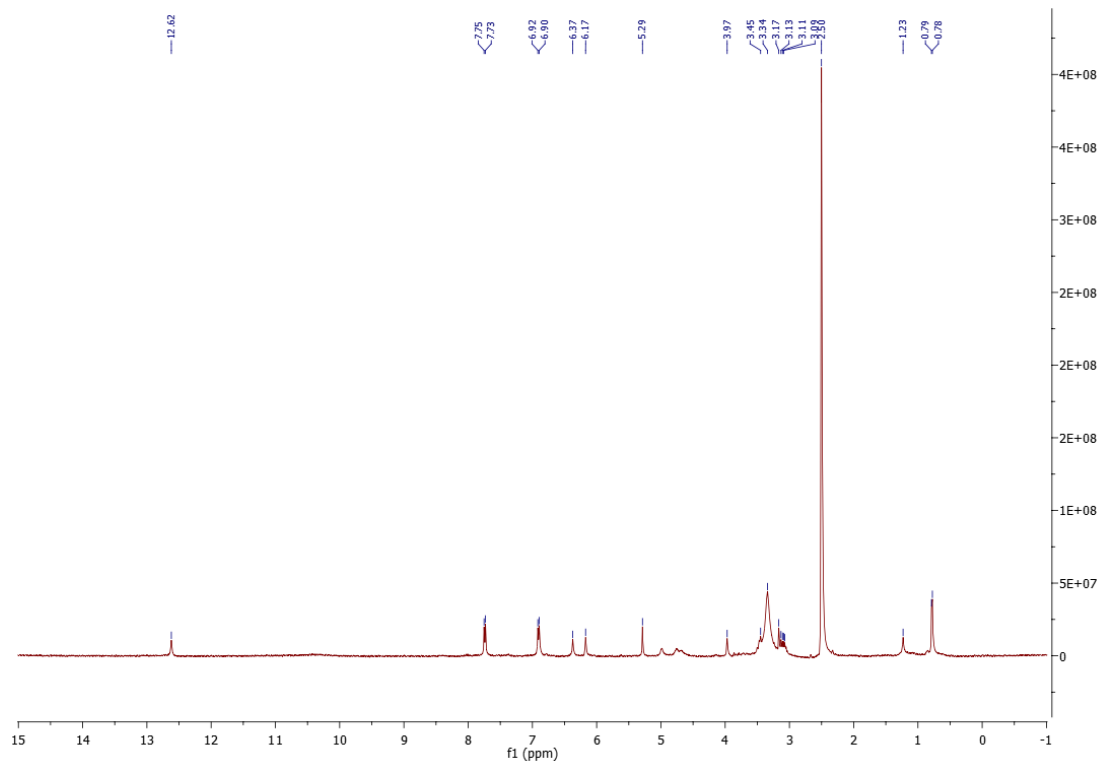


Figure 7 : Spectre ^1H de l'afzelin

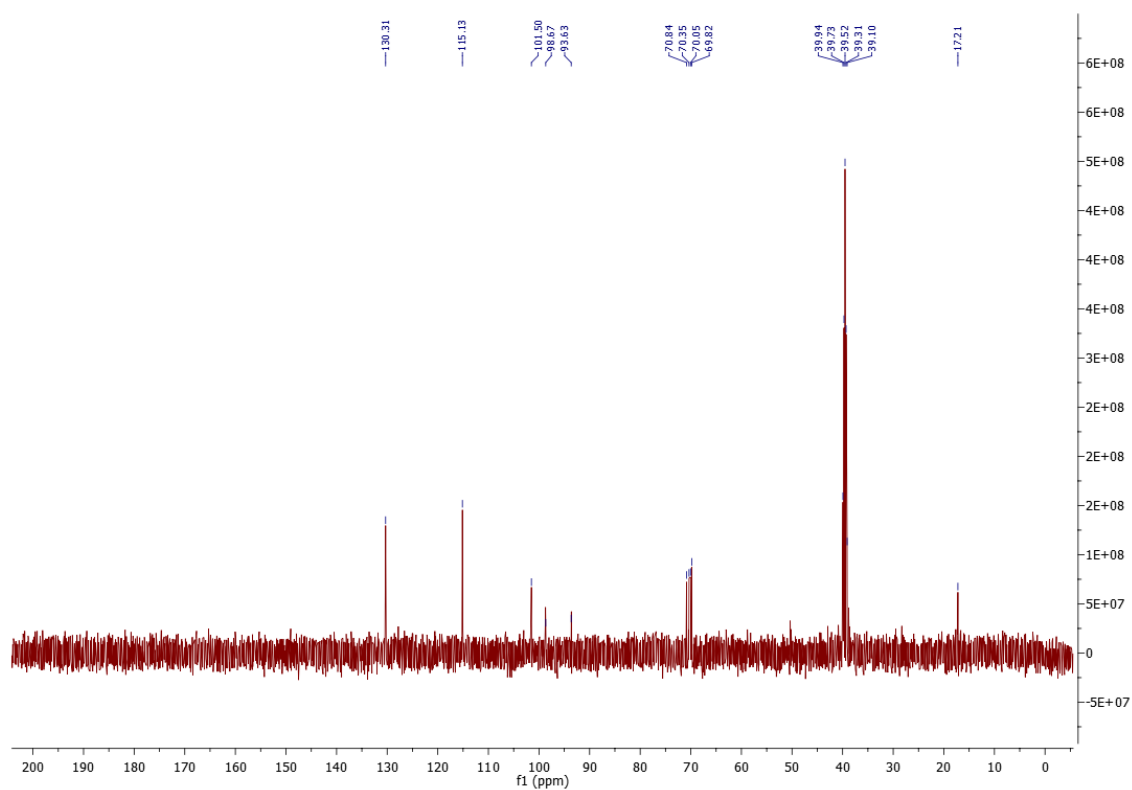


Figure 8 : Spectre DEPT135 de l'afzelin

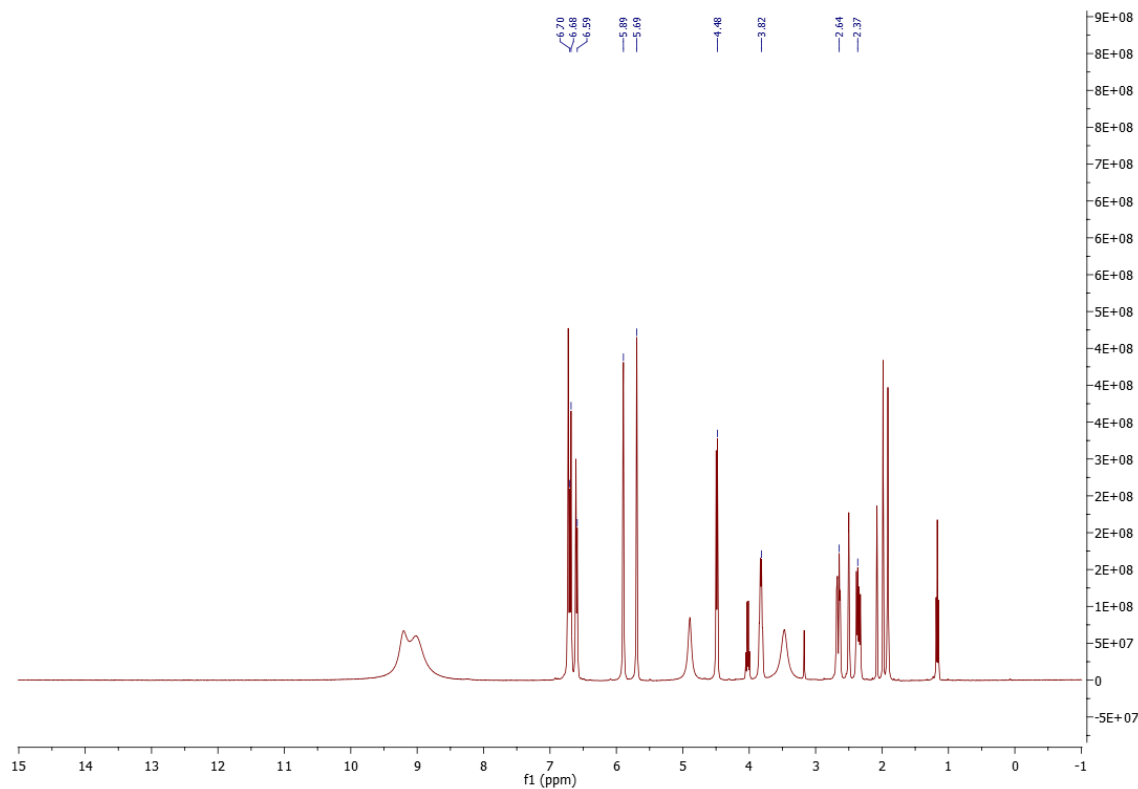


Figure 9 : Spectre ¹H de la catéchine

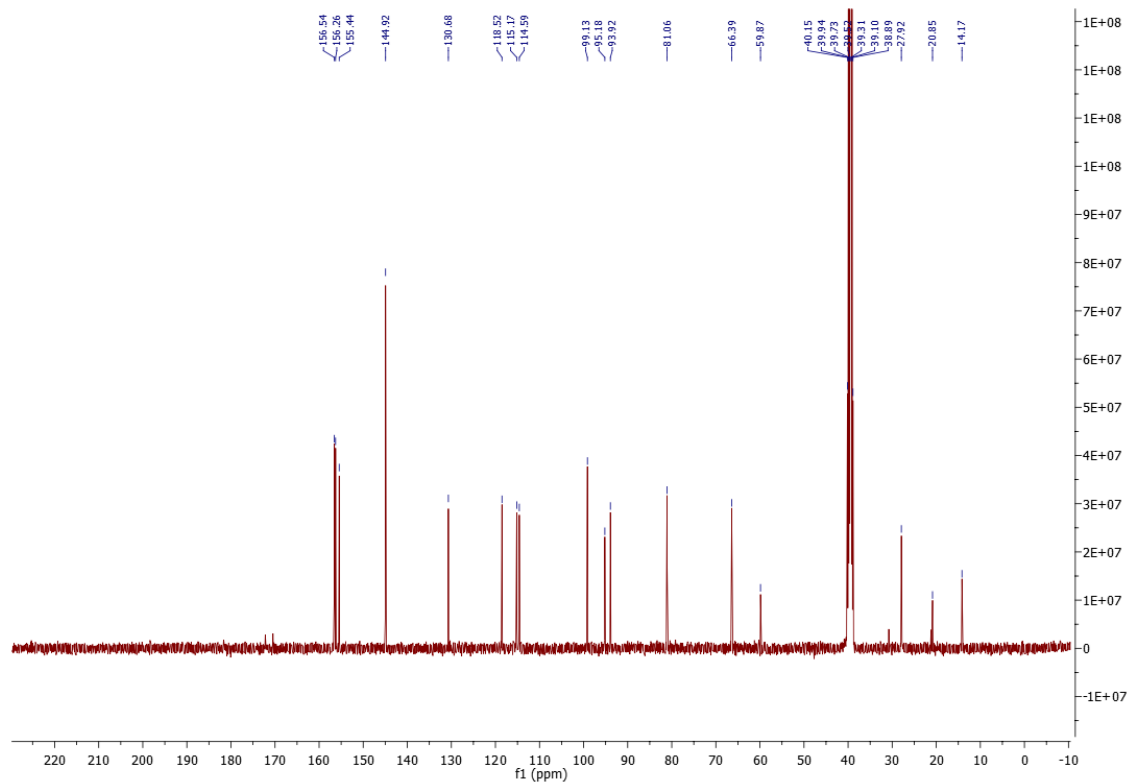


Figure 10 : Spectre ^{13}C de la catéchine

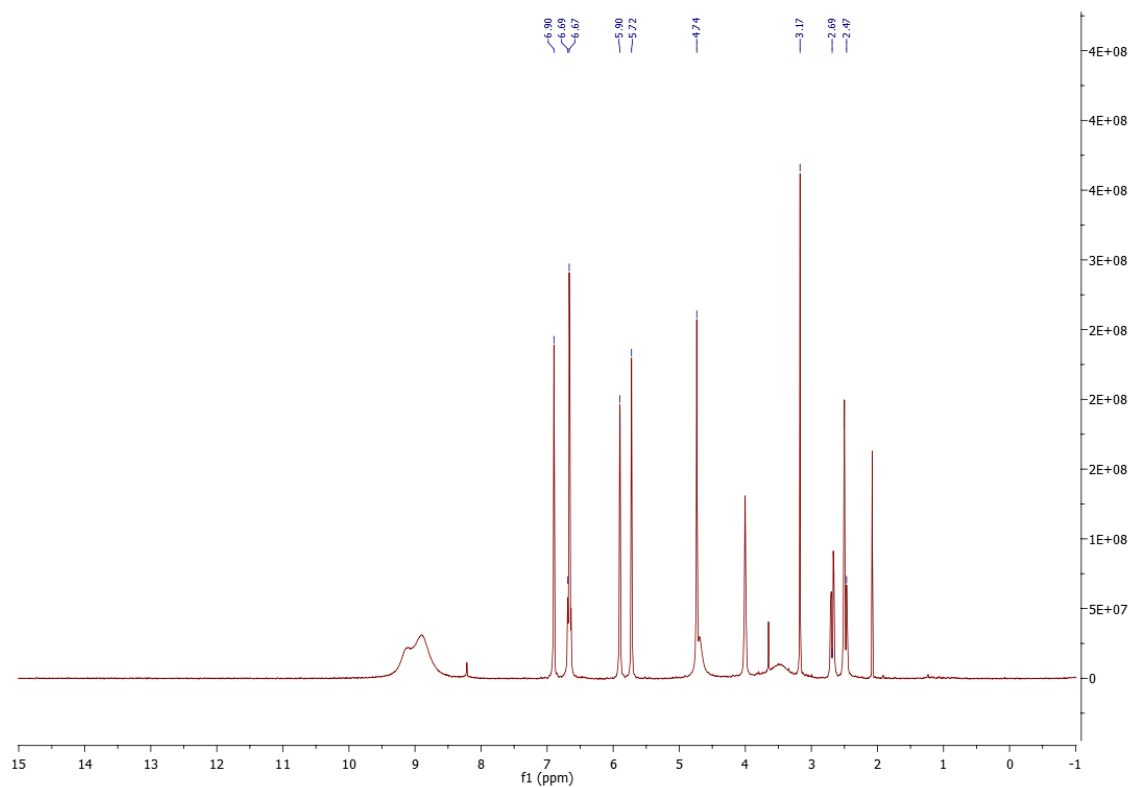


Figure 11 : Spectre ^1H de l'épicatéchine

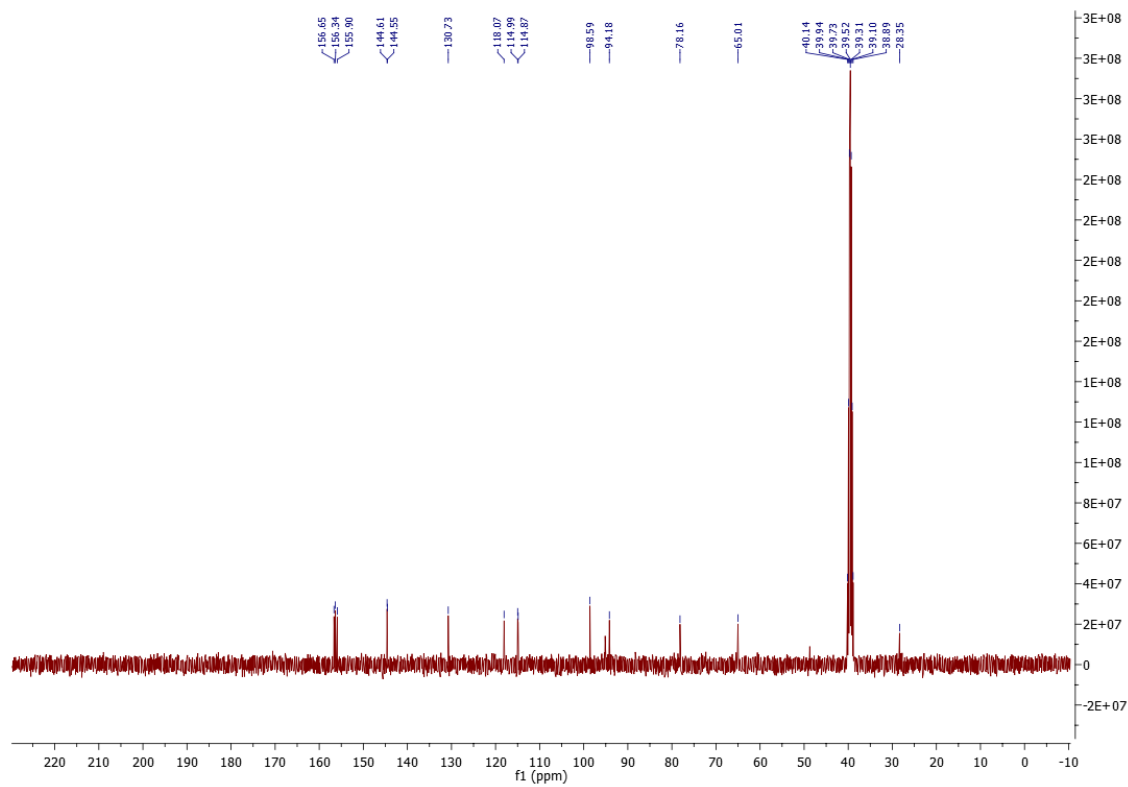


Figure 12 : Spectre ^{13}C de l'épicatéchine

ANNEXE 2 : Extraction de fleurs de thé du Labrador et fractionnement bioguidé par l'activité biologique.

Cette annexe présente les travaux effectués au cours du projet qui ne font pas partie des articles scientifiques présentés dans le chapitre III.

Matériel & Méthodes

Extractions des fleurs de *Rhododendron groenlandicum*

Deux méthodes d'extractions, la macération et le montage à reflux, ont été testées afin de trouver celle qui donnerait le meilleur rendement ainsi que la meilleure activité biologique. Les fleurs ont toujours été extraites 3 fois successivement avec les méthodes respectives.

Tableau 3 : Récapitulatif des extractions de fleurs

Méthode d'extraction	Temps (heure)	% de solvant
Macération méthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Macération éthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Macération méthanol/eau	6	50% , 75% et 100%
Macération éthanol/eau	6	50% , 75% et 100%
Reflux méthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Reflux éthanol/eau	3	50% , 75% et 100%

Résultats

Extractions des fleurs de *Rhododendron groenlandicum*

Voici ci-dessous un tableau récapitulant les rendements obtenus lors des différentes extractions des fleurs de *R. groenlandicum*.

Tableau 4 : Rendement des extractions de fleurs

	Temps	50%	75%	100%
Macération méthanol /eau	3h	40%	42%	37%
Macération éthanol/eau	3h	43%	44%	30%
Macération méthanol/eau	6h	36%	36%	37%
Macération éthanol/eau	6h	34%	38%	25%
Reflux méthanol/eau	2h30	47%	48%	43%

Reflux éthanol/eau	2h30	52%	52%	41%
---------------------------	------	-----	-----	-----

L'extraction à reflux éthanol/eau 50% et 75% sont celles qui ont les meilleurs rendements. Néanmoins, la majorité des rendements obtenus restent satisfaisants.

ClicCours.com

ANNEXE 3 : Isolation et caractérisation de composés à partir des feuilles de thé du Labrador.

Matériel et Méthodes

Extraction des feuilles de *Rhododendron groenlandicum*

Les deux méthodes utilisées précédemment ont également été testées ici afin de trouver celle qui donnerait le meilleur rendement ainsi que la meilleure activité biologique. Les feuilles ont toujours été extraites 3 fois successivement avec les méthodes respectives.

Tableau 5 : Récapitulatif des extractions de feuilles

Méthode d'extraction	Temps (heures)	% de solvant
Macération méthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Macération éthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Macération méthanol/eau	6	50% , 75% et 100%
Macération éthanol/eau	6	50% , 75% et 100%
Reflux méthanol/eau	3	50% , 75% et 100%
Reflux éthanol/eau	3	50% , 75% et 100%

Fractionnement et isolation des composés contenus dans les feuilles

Une extraction liquide-liquide au butanol/eau a été réalisée sur les extraits de feuilles. La phase butanol a ensuite été séchée afin d'être fractionnée à l'aide d'une colonne DIAION. Le gradient de solvant était le suivant : eau (F1), 30% méthanol (F2), 50% méthanol (F3), 80% méthanol (F4), 100% méthanol (F5) suivi d'un lavage à l'acétate d'éthyle (F6). La fraction F4 a été séparée à l'aide d'une colonne basse pression de 2 heures avec le gradient suivant : chloroforme méthanol eau (50 : 7 : 0,5) + 0,1% d'acide formique, chloroforme méthanol eau (50 : 15 : 1) + 0,1% d'acide formique, chloroforme méthanol eau (50 : 15 : 1) + 0,1% d'acide formique, chloroforme méthanol eau (45 : 15 : 1) + 0,1% d'acide formique, chloroforme méthanol eau (40 : 14 : 2) + 0,1% d'acide formique suivi d'un lavage au méthanol. 10 fractions ont été recueillies. Une seconde colonne basse pression a été réalisée sur la fraction F4.4. Une colonne de phase inverse a été utilisée avec une phase mobile acétonitrile/eau de 5% à 30%, pendant 2 heures. 3 fractions ont été recueillies.

Par manque de temps et de masses, différentes fractions ont été injectées par HPLC ainsi que les standards de l'uvaol, la catéchine, l'arbutine, l'acide ursolique et l'acide férulique, afin de comparer les pics et leur spectre UV, ainsi que la masse moléculaire pour pouvoir identifier des composés dans les feuilles du *R. groenlandicum*. La colonne utilisée pour ses analyses était une C18 avec une phase mobile méthanol/eau avec 0,1% d'acide formique avec un gradient allant de 0 à 100% pendant 50 minutes.

Résultats

Extraction des feuilles de *Rhododendron groenlandicum*

Voici ci-dessous un tableau récapitulant les rendements obtenus lors des différentes extractions des feuilles de *R. groenlandicum*.

Tableau 6 : Rendement des extractions de feuilles

	Temps	50%	75%	100%
Macération méthanol /eau	3h	33%	29%	35%
Macération éthanol/eau	3h	28%	44%	22%
Macération méthanol/eau	6h	35%	35%	34%
Macération éthanol/eau	6h	33%	14%	76%
Reflux méthanol/eau	2h30	25%	30%	38%
Reflux éthanol/eau	2h30	28%	33%	69%

La macération éthanol/eau 100% est celle qui obtient le meilleur rendement.

Extraction à grand échelle des feuilles de *Rhododendron groenlandicum*

223,5g de poudre de feuilles de *R. groenlandicum* sont placés dans un ballon de 5L avec MeOH:H₂O (50 :50). La méthode utilisée était un montage à reflux pendant 2h30. A la fin de l'extraction, le solvant récupéré est filtré et évaporé afin d'être séparé par extraction liquide-liquide.

Extraction liquide-liquide des feuilles de *Rhododendron groenlandicum*

Clicours.COM

Une extraction liquide-liquide a été réalisée avec une phase butanol et une phase eau. 310,6mg ont été récupérés pour la fraction au butanol. Voici ci-contre, une Chromatographie sur Couche Mince (CCM) récapitulative des deux fractions.

Le milieu utilisé était CHCl_3 : MeOH : H_2O dans les proportions 26:14:3. Le révélateur est ici NP/PEG.

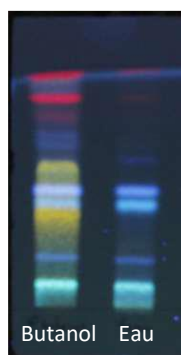


Figure 13 : CCM de l'extraction liquide-liquide

Colonne DIAION de l'extrait butanolique de feuilles de *Rhododendron groenlandicum*

5,0g de l'extrait butanolique ont été déposés sur la colonne. Le gradient était le suivant : eau, 30% MeOH, 50% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH suivi d'un lavage à AcOET puis d'un autre au MeOH. 6 fractions ont été récupérées, correspondant chacune à un gradient de solvant, la dernière étant les 2 lavages finaux.

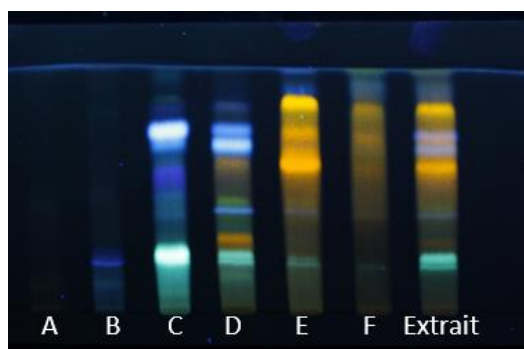


Figure 14 : CCM récapitulative de la colonne DIAION réalisée sur l'extrait butanolique de feuille de *R. groenlandicum*

Les fractions sont résumées sur cette CCM récapitulative, élue dans un milieu CHCl_3 :MeOH: H_2O (26:14:3) révélée au NP/PEG à 365nm.

Des tests biologiques ont été menés sur toutes les fractions, les résultats pour les tests anti-inflammatoires ou IC_{50} ont été concluants seulement sur la fraction F (IC_{50} 22 ± 5 $\mu\text{g/mL}$).

De ce fait, la suite du projet a été menée à partir de la fraction D, car les composés y semblaient mieux séparés. De plus, c'était l'une des fractions avec le meilleur résultat biologique dans le test antioxydant ORAC.

Tableau 7 : Résultats biologiques antioxydant des fractions de colonne DIAION sur l'extrait butanolique de feuilles

Echantillons	ORAC $\mu\text{mol Trolox/mg}$	Cellulaire IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
A	0,42 \pm 0,05	5 \pm 1
B	0,91 \pm 0,11	3 \pm 1
C	8,8 \pm 1,7	0,1 \pm 0,1
D	11 \pm 1,7	0,6 \pm 0,2
E	7,9 \pm 0,98	1,1 \pm 0,1
F	1,8 \pm 0,28	0,2 \pm 0,3

Colonne basse pression de la fraction D de la colonne DIAION de feuille de *Rhododendron groenlandicum*

Une colonne basse pression a été réalisée sur la fraction D vue précédemment, en phase normale avec une phase mobile contenant du chloroforme, du méthanol et de l'eau et 0,1% d'acide formique selon les proportions suivante :

- 50 : 7 : 0,5
- 50 : 15 : 1
- 45 : 15 : 1
- 40 : 14 : 2
- 100% MeOH

La colonne a été réalisée sur 2 heures. 10 fractions ont été recueillies : D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, et D10. Des tests biologiques ont été effectués sur toutes les fractions, sauf la J par manque de masse. La CCM ci-dessous récapitule les fractions obtenues lors de cette colonne. Elle a été éluée dans le même milieu que la précédente, c'est-à-dire $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (26:14:3), révélée au NP/PEG à 365nm.

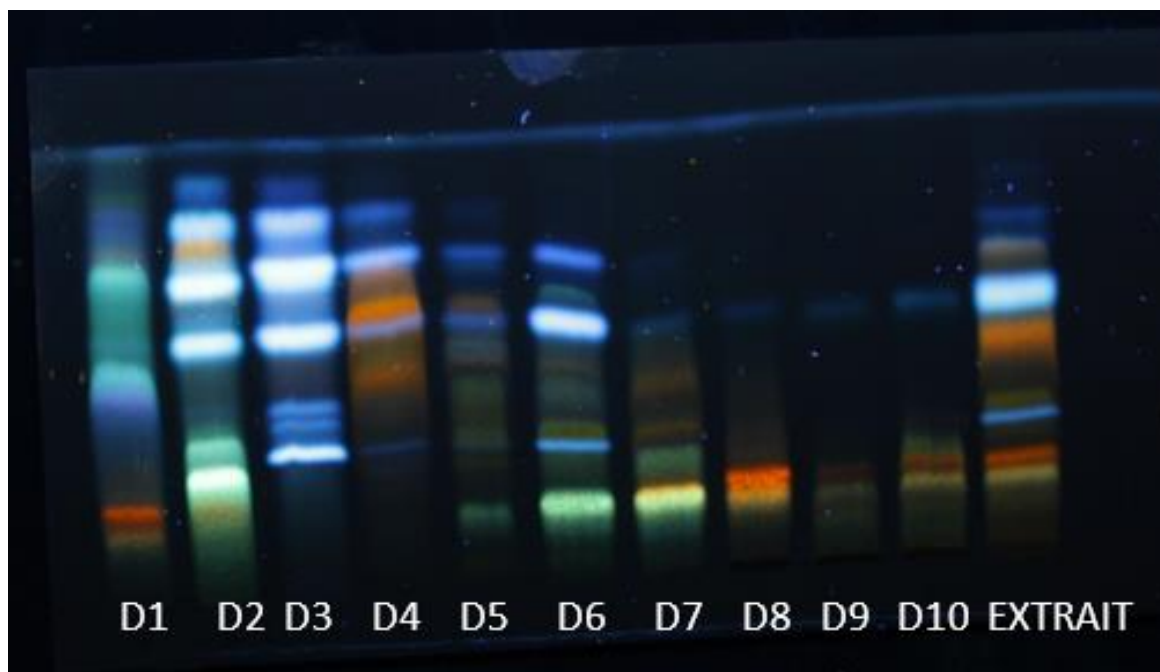


Figure 15 : CCM récapitulative de la colonne DIAION réalisée sur la fraction D de la colonne DIAION de l'extrait butanolique de feuilles de *R. groenlandicum*

Tableau 8 : Résultats biologiques antioxydant des fractions de colonne basse pression de l'extrait de feuilles

Echantillons	ORAC $\mu\text{mol Trolox/mg}$	Cellulaire IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
D1	$2,3 \pm 0,14$	5 ± 1
D2	$3,1 \pm 0,78$	$0,7 \pm 0,1$
D3	$1,9 \pm 0,21$	$3 \pm 0,5$
D4	$3,5 \pm 0,37$	$2 \pm 0,2$
D5	$10 \pm 2,6$	$0,3 \pm 0,1$
D6	$6,7 \pm 1,1$	$0,5 \pm 0,1$
D7	$4,9 \pm 0,72$	$0,3 \pm 0,1$
D8	$5,6 \pm 0,47$	$0,4 \pm 0,1$
D9	$4,7 \pm 0,67$	$0,1 \pm 0,1$

Encore une fois, les résultats de tests biologiques démontrent une bonne activité antioxydante pour les fractions de la colonne basse pression, notamment les fraction D5, D7 et D9 au niveau du test cellulaire.

Composés identifiés par HPLC

Les analyses HPLC réalisées sur différentes fractions de la première colonne DIAION

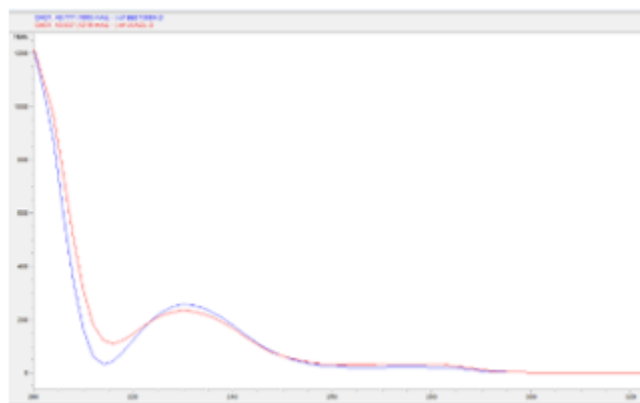
ont permis d'identifier plusieurs composés. Les composés confirmés lors de ces analyses étaient l'uvaol, la catéchine et l'arbutine, d'ores et déjà référencées dans la littérature.

ANNEXE 4

La fraction D1 comporterait de l'uvaol d'après les chromatogrammes (chromatogramme 1) et la courbe UV (courbe 1). Les deux pics possèdent respectivement des temps de rétention et des masses molaires identiques : $t_{R1}= 33,6$ min, $t_{R2}= 43,8$ min avec une masse molaire $M= 723,6$ g/mol. De plus, les courbes UV possèdent les mêmes maximums et minimums.



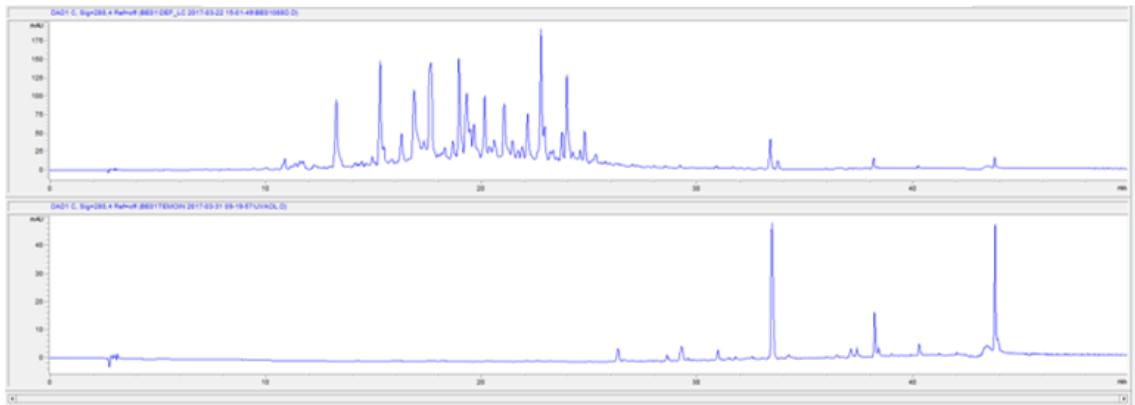
Chromatogramme 1 : chromatogramme de la fraction D1 (en haut) et de l'uvaol (en bas)



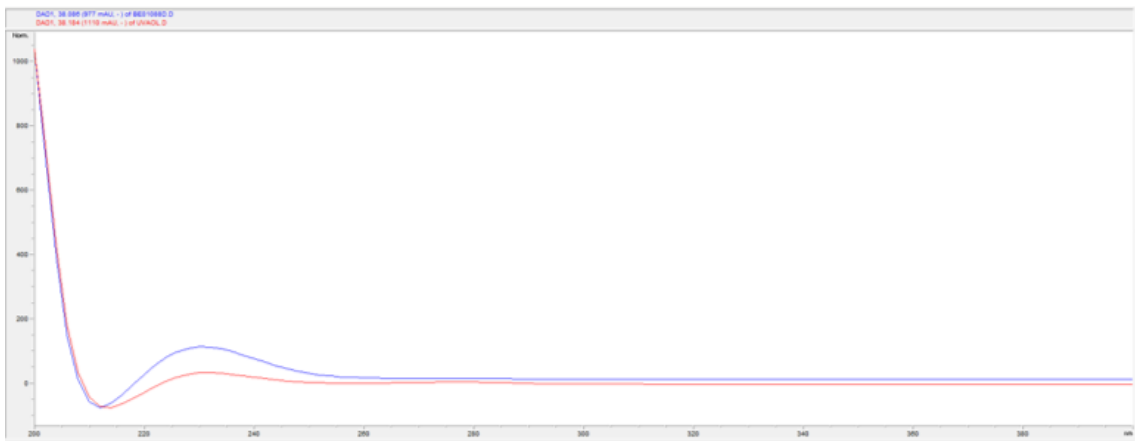
Courbe 1 : spectre UV de la fraction D1 (bleu) et de l'uvaol (rouge)

ANNEXE 5

D'après la comparaison du chromatogramme de l'uvaol avec celui de la fraction D4 (chromatogramme 2), celle-ci en posséderait. Les deux pics possèdent respectivement des temps de rétention et des masses molaires identiques avec une masse molaire $M = 723,6$ g/mol. De plus, les courbes UV possèdent les mêmes maximums et minimums.



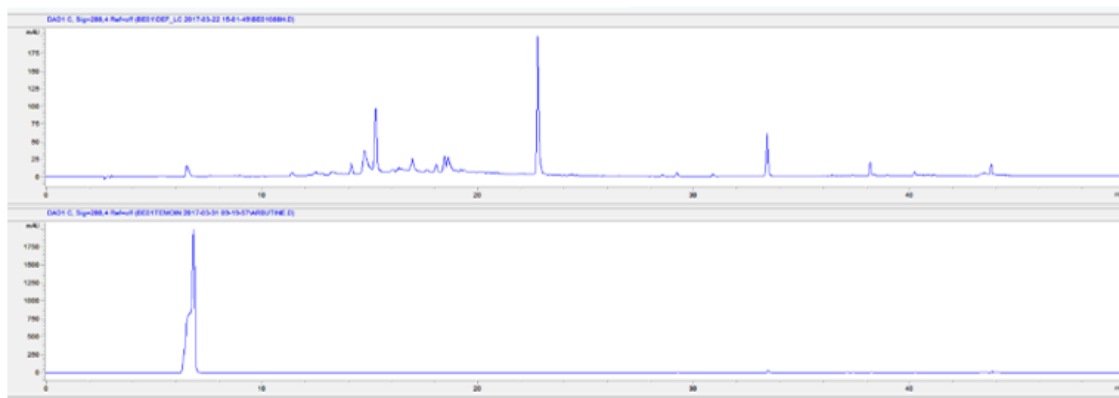
Chromatogramme 2 : chromatogramme de la fraction D4 (en haut) et de l'uvaol (en bas)



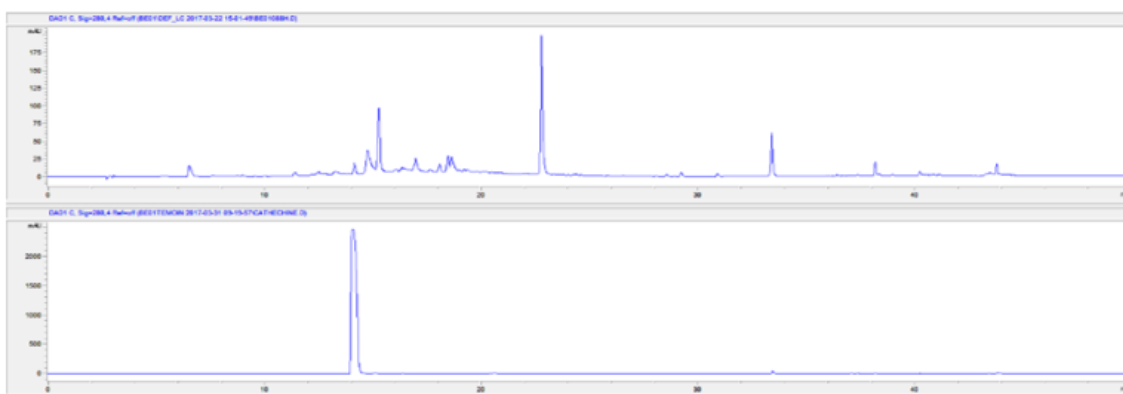
Courbe 2 : spectre UV de la fraction D1 (bleu) et de l'uvaol (rouge)

ANNEXE 6

La fraction D8 posséderait de l'arbutine (chromatogramme 3) et de la catéchine (chromatogramme 4), d'après la comparaison des chromatogrammes. Les pics possèdent des temps de rétention identiques $t_R = 6,5$ min. Le pic de l'arbutine possède une masse molaire de 317,1 g/mol tout comme celui de la fraction D8. Les pics du chromatogramme 4 ont des temps de rétention et des masses molaires identiques $t_R = 14,5$ min et $M = 289,1$ g/mol.



Chromatogramme 3 : chromatogramme de la fraction D8 (en haut) et de l'arbutine (en bas)



Chromatogramme 4 : chromatogramme de la fraction D8 (en haut) et de la catéchine (en bas)