UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

ERIC CHIASSON

Bachelier ès Sciences (CHIMIE)

Isolation, caractérisation et évaluation du potentiel bioactif des bourgeons de *Populus balsamifera*

FÉVRIER 2012

RÉSUMÉ

Le *Populus balsamifera* est un feuillu commun d'Amérique du Nord. Cet arbre était utilisé par les amérindiens pour lutter contre différents types d'infections. L'identification du ou des composés responsables de l'activité antibactérienne des extraits de bourgeon constitue l'objectif principal de ce projet de recherche. Les extraits ont été obtenus par macération à reflux avec différents mélange d'éthanol/eau. Le fractionnement de ces extraits a été guidé par leurs activités biologiques. Plusieurs produits naturels ont été isolés en utilisant une succession de techniques de purification (séparation par partition dans différents solvants et approches chromatographiques). Certaines de ces molécules ont de fortes activités anticancéreuses et antibactériennes, notamment sur le SARM.

Dix huit molécules ont été isolées et caractérisées. De ce nombre, quatre flavonoïdes (**14** à **17**), trois dérivés de flavonoïdes (**7** à **9**), deux acides phénoliques (**1** et **10**), six dihydrochalcones (**2**, **3**, **11**, **12**, **13** et **18**) ainsi que trois dérivés de chalcones (**4** à **6**). Les composés **4** à **6** constituent une nouvelle famille de composés phénoliques que nous avons nommée balsacone. Les propriétés cytotoxique et antibiotique des composés ont été évaluées sur des lignées de cellules cancéreuses ainsi que sur des bactéries sensibles et résistantes. Les résultats montrent que deux des trois dérivés de flavonoïdes (**7** et **8**) ont une forte activité cytotoxique (IC_{50} = 5,0 à 5,1 μM) envers les cellules cancéreuses du

poumon (A549) avec un facteur de sélectivité supérieur à 2 par rapport aux cellules saines (WS1) (IC_{50} = 13 à 14 μM).

Les composés **4** à **9** ont montré une activité antibactérienne (IC_{50} = 1,26 à 5,9 μM) élevée sur le *Staphylococcus aureus*. Des tests effectués sur différents types de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) indiquent que ces composés sont fortement actifs envers ces souches bactériennes (IC_{50} = 0,60 à 10,8 μM).

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur André Pichette pour m'avoir donnée l'opportunité de découvrir davantage le domaine des produits naturels. L'expérience et les connaissances acquises lors de ce projet de recherche m'a été utile à de nombreuses occasions dans ma nouvelle carrière. Ses précieuses suggestions ainsi que ses nombreux encouragements m'ont permis de réaliser cet ambitieux projet.

Je remercie également le professeur Jean Legault, mon co-directeur. Son expertise dans le domaine de la biochimie a permis d'apporter une dimension essentielle à ce projet de recherche. Son équipe m'a également été d'une aide précieuse, particulièrement Catherine Dussault et Maxime Lebrun.

De nombreuses personnes ont contribué au succès du projet. Tout d'abord, j'aimerais remercier Serge Lavoie pour son expertise RMN mais également pour ses nombreux conseils prodigués. Je tiens également à souligner le travail de Carole Grenon qui m'a permis de perfectionner mes connaissances sur le HPLC-MS. Je m'en voudrais de ne pas mentionner le support constant que m'a apporté le Dr. Vakhtang Mshvildadze qui a partagé ses nombreuses connaissances de la phytochimie et du monde en générale. Je

remercie également l'étudiant au 1er cycle en chimie, Jonathan Nadeau, pour l'isolation des molécules **17** et **18**. Je lui souhaite la meilleure des chances dans sa nouvelle carrière.

Un merci spécial à ses personnes qui m'ont permis de garder le sourire durant cette période. Mes parents, Martial et Micheline, qui m'ont toujours soutenu depuis ma naissance. Ma compagne, Janie Bouchard, pour son sourire, son soutien et ses nombreuses corrections. Mon amie, Tessa Paradis, pour sa patience et sa gentillesse. Et finalement, un merci énorme à Jimmy Bouchard, Dominic Thibault, Sébastien Vanier et Philippe Dufour pour les discussions sur la chimie et la vie en générale. Travailler avec vous a été un privilège!

TABLE DES MATIÈRES

1. CHAPITRE 1 – INTRODUCTION *1*

1.1 Problématique 2

1.2 Revue de littérature 4

1.2.1 *Populus balsamifera* 4

1.2.2 Composition chimique 6

1.2.3 Activités biologiques 7

1.2.4 Propolis 9

1.2.5 Notions sur le développement de résistance bactérienne face aux antibiotiques utilisés en clinique et approche utilisée généralement pour la découverte de nouveaux antibiotiques 10

2. CHAPITRE 2 - MÉTHODOLOGIE *12*

2.1 Échantillonnage et préparation de l'extrait 13

2.2 Fractionnement primaire de l'extrait 13

2.2.1 Fractionnement de 2F par HPLC 14

2.2.1.1 Purification de 2F-H 15

2.2.2 Fractionnement de 1F 15

2.2.3 Fractionnement de 3F 16

2.2.3.1 Fractionnement de la fraction 3F2-2 18

2.3 Considérations générales 18

2.3.1 Analyses HPLC 18

2.3.2 Analyses RMN 19

2.4 Activité biologique 19

2.4.1 Condition de croissance des cultures cellulaires 19

2.4.2 Analyses cytotoxiques 20

2.4.3 Analyses antibactériennes 21

2.4.4 Tests d'activité sur SARM 21

2.4.5 Diffusion du disque 22

3. CHAPITRE 3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION *23*

3.1 Extraction des produits naturels des bourgeons 24
3.2 Fractionnement de l'extrait brut et évaluation de l'activité biologique des fractions 25
3.2.1 Fractionnement de 2F par HPLC 26
3.2.1.1 Fractionnement de 2FH 27
3.2.2 Fractionnement de 1F 28
3.2.2.1 Fractionnement de 1F2 28
3.2.2.2 Fractionnement de 1F5 par HPLC 29
3.2.3 Fractionnement de 3F 30
3.2.3.1 Fractionnement de 3F2 30
3.2.3.1.1 Fractionnement de 3F2-2 31
3.3 Identification des composés isolés 33
3.3.1 Acides phénoliques (1, 10) 33
3.3.2 Dihydrochalone (2-3, 11-13, 18) 34
3.3.3 Balsacone (4, 5 et 6) 38
3.3.4 Composés 7-9 42
3.3.5 Flavonoïdes (14-17) 47
3.3.6 Autres pics 50
3.4 Activités biologiques 51
3.4.1 Activités cytotoxiques 51
3.4.1.1 Composés 7, 8 et 9 52
3.4.1.2 Balsacones 53
3.4.1.3 Autres composés 53
3.4.2 Activités antibactériennes 54
3.4.2.1 Composés 7, 8 et 9 54
3.4.2.2 Balsacones 55
3.4.2.3 Autres composés 55
3.4.3. Activités antibactériennes sur SARM 56
4. CHAPITRE 4 – CONCLUSION 57
4.1 Conclusions générales 58
4.2 Perspectives futures 59

Rapport-Gratuit.com

BIBLIOGRAPHIE *61*

ANNEXES *66*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photographie d'un Populus balsamifera 5
Figure 2 : Photographie des feuilles à maturité 6
Figure 3 : Squelette de base des flavanones et des chalcones 7
Figure 4 : Photographie de la propolis d'une ruche d'abeilles 9
Figure 5 : Chromatogramme HPLC de la fraction 2F 26
Figure 6 : Chromatogramme HPLC de la fraction 2FH 27
Figure 7 : Chromatogramme HPLC de 1F5 29
Figure 8 : Chromatogramme HPLC de la fraction 3F2-2 31
Figure 9 : Chromatogramme HPLC de 3F2-2B 32
Figure 10 : Récapitulatif du fractionnement des bougeons 32
Figure 11 : Acide coumarique (1) 33
Figure 12 : Acide cinnamique (10) 34
Figure 13 : 2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone (2) 35
Figure 14 : 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (3) 36
Figure 15 : 2',4,6'-trihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone (11) 36
Figure 16 : 2',6'-dihydroxy-4,4'-diméthoxydihydrochalcone (12) 37
Figure 17 : 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone (13) 38
Figure 18 : Phlorétine (18) 38
Figure 19 : Balsacones A, B et C (4, 5 et 6) 42
Figure 20 : Composés 7, 8 et 9 46
Figure 21 : Pinocembrin (14) 47
Figure 22 : Galangin (15) 48
Figure 23 : Pinobanksin (16) 49
Figure 24 : Quercétine (17) 50
Figure 25 : Spectre RMN ^{1}H du composé 4 75
Figure 26 : Spectre RMN ^{13}C du composé 4 76
Figure 27 : Spectre RMN ^{1}H du composé 5 76
Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C du composé 5 77
Figure 29 : Spectre RMN ^{1}H du composé 6 77
Figure 30 : Spectre RMN ^{13}C du composé 6 78
Figure 31 : Spectre RMN ^{13}C du composé 7 78
Figure 32 : Spectre RMN ^{1}H du composé 7 79
Figure 33 : Spectre RMN ^{1}H du composé 8 79
Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C du composé 8 80
Figure 35 : Spectre RMN ^{1}H du composé 9 80
Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C du composé 9 81
Figure 37 : Spectre RMN ^{13}C du composé 1 81

Figure 38 : Spectre RMN ^{1}H du composé 1 82
Figure 39 : Spectre RMN ^{13}C du composé 2 82
Figure 40 : Spectre RMN ^{1}H du composé 2 83
Figure 41 : Spectre RMN ^{1}H du composé 3 83
Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C du composé 3 84
Figure 43 : Spectre RMN ^{13}C du composé 10 84
Figure 44 : Spectre RMN ^{1}H du composé 10 85
Figure 45 : Spectre RMN ^{13}C du composé 11 85
Figure 46 : Spectre RMN ^{13}C du composé 12 86
Figure 47 : Spectre RMN ^{1}H du composé 13 86
Figure 48 : Spectre RMN ^{13}C du composé 13 87
Figure 49 : Spectre RMN ^{1}H du composé 14 87
Figure 50 : Spectre RMN ^{13}C du composé 14 88
Figure 51 : Spectre RMN ^{13}C du composé 15 88
Figure 52 : Spectre RMN ^{1}H du composé 15 89
Figure 53 : Spectre RMN ^{13}C du composé 16 89
Figure 54 : Spectre RMN ^{1}H du composé 16 90
Figure 55 : Spectre RMN ^{13}C du composé 17 90
Figure 56 : Spectre RMN ^{1}H du composé 17 91
Figure 57 : Spectre RMN ^{13}C du composé 18 91
Figure 58 : Spectre RMN ^{1}H du composé 18 92
Figure 59 : Spectre de masse du composé 11 92
Figure 60 : Spectre de masse du composé inconnu 2F-J 93
Figure 61 : Spectre de masse du composé 3 93
Figure 62 : Spectre de masse du composé 8 94
Figure 63 : Spectre de masse du composé 9 94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rendements et activités biologiques des premières fractions de l'extrait..... 24
Tableau 2: Masses, rendements et activités biologiques des fractions issues de 1F 28
Tableau 3: Masses, et rendements des fractions issues de 1F2 29
Tableau 4: Masses, rendements et activités sur S.aureus des fractions de 3F..... 30
Tableau 5: Assignation des signaux RMN (400 MHz) ^{1}H et ^{13}C de la balsacone A dissous dans 1 ml de chloroforme deutéré ($CDCl_3$) avec 1% de TMS..... 40
Tableau 6: Assignation des signaux RMN (400MHz) ^{1}H et ^{13}C du composé 8 dissous dans 1 ml de chloroforme deutéré ($CDCl_3$) avec 1% TMS..... 45
Tableau 7: Activités biologiques des molécules isolées..... 52
Tableau 8: Activité antibactérienne des molécules 4 à 9, de 2FJ et de quatre antibiotiques commerciaux sur différentes souches de S.aureus..... 57
Tableau 9: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de l'acide coumarique..... 67
Tableau 10: Assignation des signaux NMR ^{1}H et ^{13}C du 2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone 67
Tableau 11: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone 68
Tableau 12: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de l'acide cinnamique 68
Tableau 13: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la balsacone B 69
Tableau 14: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la balsacone C 70
*Tableau 15: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **9**..... 71*
Tableau 16: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',6'-dihydroxy-4,4'-diméthoxydihydrochalcone 72
Tableau 17: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone 72
Tableau 18: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du pinocembrin 73
Tableau 19: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',4',6',4-tetrahydoxydihyrochalcone 73
Tableau 20: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du pinobanksin..... 74
Tableau 21: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la quercetine 74
Tableau 22: Activité antibactérienne des molécules 4 à 9, de 2FJ et de quatre antibiotiques commerciaux sur différentes souches de S.epidermiss. 75

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1. CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1.1 Problématique

La forêt boréale est composée de plus de 2800 espèces de plantes vasculaires (1), couvre 58% du territoire canadien et s'étend d'un océan à l'autre (2). Les autochtones peuplant cette région utilisaient déjà plusieurs de ces ressources à des fins thérapeutiques (3). Cette médecine traditionnelle s'avéra être un outil précieux pour la découverte de nouveaux médicaments. Par exemple, le paclitaxel (taxol) est un puissant agent anticancéreux provenant de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) (4) et également dans l'if du Canada (*Taxus canadensis*) (5).

Depuis plusieurs années, l'humanité fait face à de nouvelles menaces bactériologiques, dont le SARM (*Staphyloccocus aureus résistant à la méthicilline*) qui est un problème de santé publique majeur en raison de sa résistance aux antibiotiques utilisés actuellement (6). Plusieurs autres infections bactériennes telles que la tuberculose ne peuvent êtres traitées efficacement avec les antibiotiques sur le marché (7). La découverte de nouveaux antibiotiques est une préoccupation urgente pour la communauté médicale afin de faire face au phénomène de plus en plus fréquent de résistance aux antibiotiques (8). Malheureusement, plusieurs grandes industries pharmaceutiques ont délaissé le marché des antibiotiques ces dernières années, les revenus n'étant pas assez élevés (9). Les principales raisons évoquées sont la compétition engendrée par les médicaments génériques et la difficulté de découvrir de nouveaux squelettes moléculaires efficaces.

Au cours de leur histoire, les amérindiens ont utilisés une panoplie de plante pour traiter diverses infections bactérienne (3). Sur la base de cette médecine traditionnelle amérindienne, les chercheurs du laboratoire LASEVE ont évalué le potentiel thérapeutique des bourgeons du peuplier baumier (*Populus balsamifera*). Ces travaux préliminaires ont permis de démontrer que l'extrait de bourgeon de *Populus balsamifera* possédait des propriétés cytotoxiques et antibiotiques. Par conséquent, la caractérisation et l'évaluation du potentiel bio-pharmaceutique des molécules contenues dans ces bourgerons devenaient un projet de recherche fort intéressant.

Les bourgeons du peuplier baumier ont déjà été grossièrement étudiés par quelques groupes de chercheurs (10-11). Notre compréhension de ces études nous indique que le ou les éléments responsables de la bioactivité de cet arbre n'ont pas été déterminé(s). Ce travail de recherche a donc comme objectif principal l'identification des composés responsables de l'activité antibiotique de *Populus balsamifera*. Ce projet vise également l'amélioration des connaissances phytochimiques du peuplier baumier.

Afin de bien cerner le sujet, une revue de littérature a été réalisée sur les métabolites secondaires contenus dans cette matrice végétale, les méthodes utilisées pour les identifier, ainsi que leurs activités biologiques.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 *Populus balsamifera*

Le nom latin *Populus*, qui ce traduit par peuple, provient de l'antiquité, à l'époque où les romains plantaient ce type d'arbres dans les lieux publics. De la famille des salicacées (*Salicacea*), le peuplier se différencie de son cousin le saule (*Salix*) par ses bourgeons résineux ainsi que ses feuilles longuement pétiolées. Environ 35 espèces de *Populus* ont été répertoriées à travers le monde.

Le peuplier baumier (*Populus balsamifera*) peut atteindre jusqu'à 35 m de hauteur avec un diamètre de 1,3 m. Les feuilles mesurent de 7,5 à 12 cm, sont de forme ovoïde et se terminent en une pointe aiguë. L'écorce des jeunes arbres est lisse et d'un brun verdâtre alors que les adultes possèdent une écorce grise foncée avec des crêtes profondes et plates. Le bois est mou et faible, de couleur brun pâle avec un aubier épais et presque blanc. Les bourgeons mesurent environ 2,5 cm de longueur et sont recouverts de cinq écailles. Ils produisent une résine collante et sont très odorants (1).

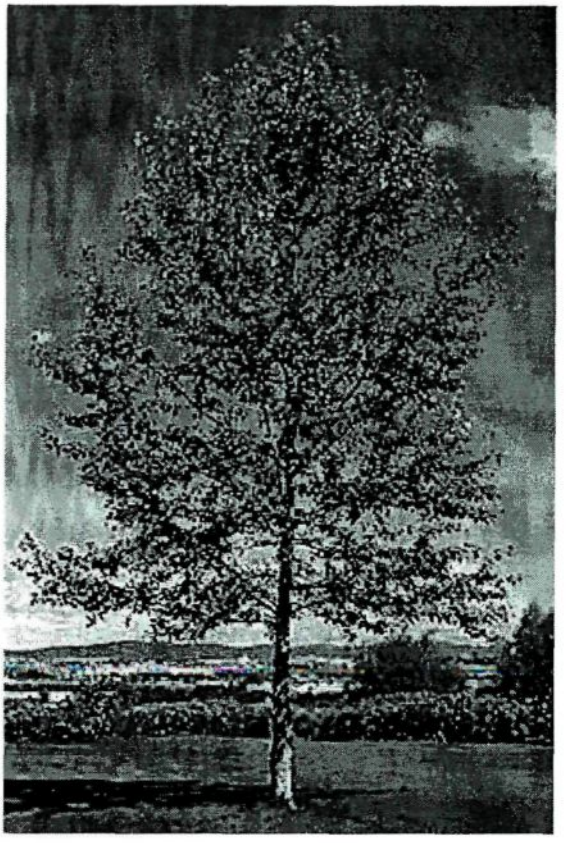


Figure 1: Photographie d'un Populus balsamifera

Les premières nations utilisaient le peuplier baumier à des fins domestiques et thérapeutiques. L'écorce était utilisée par la tribu des Ojibwa comme medium pour écrire. Le bois servait à solidifier les sacs que l'on posait sur les chevaux (3). Les bourgeons étaient utilisés afin de traiter certaines pathologies telles que les rhumatismes, les brûlures, les maux de dents ainsi que les crises d'hémorroïdes. De plus, ils étaient fréquemment utilisés comme antiseptique en raison de leurs propriétés antibactériennes (12,13).

Figure 2 : Photographie des feuilles à maturité

Les peupliers sont intéressants pour l'industrie forestière car ils poussent rapidement et se régénèrent facilement. Au Québec, ils sont récoltés principalement par les industries du bois d'œuvre et des pâtes et papiers (14).

1.2.2 Composition chimique

Plusieurs classes de produits naturels ont déjà été répertoriées dans le genre *Populus* et plus spécifiquement dans le *Populus balsamifera*. On retrouve des acides gras, des terpènes, des alcools aliphatiques ainsi que des polyphénols (15,16). La composition chimique varie généralement d'une espèce à l'autre. Des flavones, des flavanones, des prostaglandines ainsi que des glycosides phénoliques ont tous été identifiés dans les bourgeons du peuplier baumier (11, 17-19).

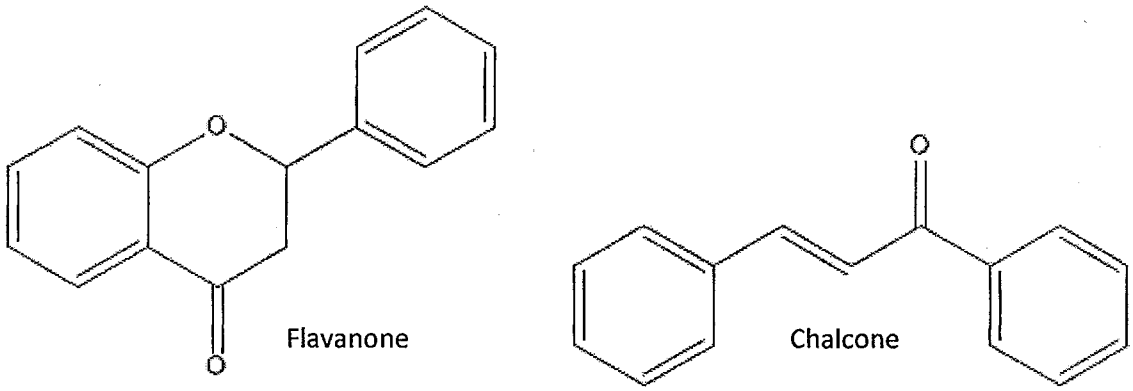


Figure 3 : Squelette de base des flavanones et des chalcones

Plusieurs de ces composés sont largement distribués dans la nature et bien connus de la communauté scientifique. Par exemple, le pinocembrin et le galangin sont des flavonoïdes qui ont été identifiés dans la propolis (20). On retrouve également des acides phénoliques comme l'acide caféique et l'acide cinnamique dans les bourgeons du *Populus nigra* (11).

1.2.3 Activités biologiques

Chaque classe de produits naturels répertoriée dans les bourgeons du peuplier baumier possède des caractéristiques propres à sa famille. Par exemple, les polyphénols sont constitués de plusieurs cycles phénoliques. On peut diviser les polyphénols en trois catégories : les tannins, les lignines et les flavonoïdes (21). En plus de leur propriété

antioxydante, qui est considérée comme étant l'activité principale de cette classe, on lui prête aussi des effets bénéfiques contre le cancer et les maladies cardiaques (22).

Les flavonoïdes sont réputés pour être d'excellents antioxydants mais certains ont également des activités anticancéreuses, antibactériennes et anti-inflammatoires (23). La quercétine figure parmi les composés les plus connus de cette famille. Elle est responsable de l'activité thérapeutique de plusieurs plantes médicinales (24). Cette molécule a également démontré une activité-inflammatoire significative (25). L'être humain peut retrouver des flavonoïdes en quantité appréciable dans des produits de consommation comme les agrumes, le thé et le raisin (26).

Les chalcones sont des intermédiaires essentielles à la biosynthèse des flavonoïdes. Elles sont composées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois carbones. On retrouve également une cétone sur le premier carbone de cette chaîne. Des activités antifongiques, anti-tumorales, antibactériennes et anti-inflammatoires ont été démontrées pour ces composés (27,28).

1.2.4 Propolis

La propolis, une cire produite par les abeilles, est souvent composée en partie par des ingrédients provenant des bourgeons de *Populus balsamifera* (20). La propolis récupérée dans les ruches en périphérie d'une forêt riche en peuplier baumier contient probablement une proportion importante de leur résine. On retrouve la propolis sous la forme d'un sirop allant du brun foncé au vert pâle. Les abeilles récoltent les ingrédients dans leur environnement immédiat, ce qui explique les différences dans la composition des propolis en fonction de leur localisation géographique. Il a été possible de répertorier jusqu'à 150 composés dans cette matrice (29).

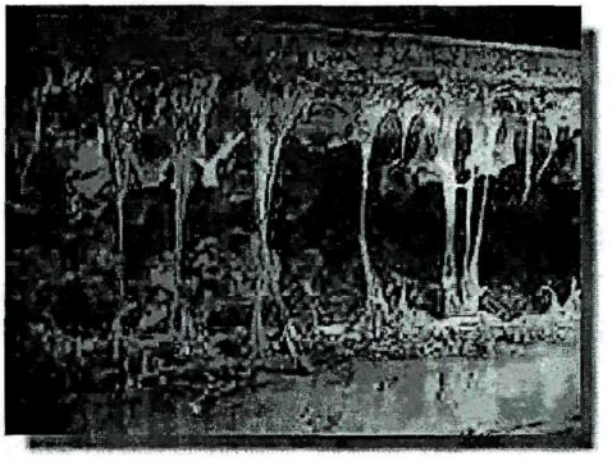


Figure 4 : Photographie de la propolis d'une ruche d'abeilles

Alors qu'autrefois on attribuait que des propriétés physiques aux propolis (renforcement et réparation des parois de la ruche), des études récentes suggèrent que les abeilles pourraient également utiliser cette matrice pour repousser les parasites et prévenir

certaines pathologies. La propolis est déjà disponible commercialement dans le rayon des produits naturels de plusieurs commerces. On peut la retrouver sous diverses formes : cire, baume, résine, etc. On lui prétend des activités antibactériennes et antifongiques, ainsi qu'une certaine efficacité pour réduire la douleur causée par les brûlures (30). Comme la composition de chaque propolis est variable, leurs propriétés thérapeutiques le sont tout autant.

1.2.5 Notions sur le développement de résistance bactérienne face aux antibiotiques utilisés en clinique et approche utilisée généralement pour la découverte de nouveaux antibiotiques

Les bactéries possèdent un système de défense contre les antibiotiques qui engendre un processus de résistance naturelle. En effet, lorsqu'une infection n'est pas totalement éliminée par le médicament, certaines bactéries ayant survécues au traitement se reproduisent et deviennent plus résistantes face à ce médicament. La posologie qui n'a pas été respectée ainsi que l'abus d'antibiotiques pour traiter des maladies n'ayant aucun lien avec les bactéries sont les causes principales de l'accélération du phénomène de résistance (31).

Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques sur le marché peuvent être sujettes à ce phénomène en raison de mutations génétiques. Les cas les plus recensés sont ceux de

Rapport-Gratuit.com

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM). La demande pour de nouvelles classes d'antibiotiques est énorme. En effet, les bactéries développent des résistances non seulement envers une molécule en particulier mais également, dans quelques cas, envers certains dérivés moléculaires. Paradoxalement, il est quelquefois possible de retarder temporairement cette résistance en modifiant la structure chimique de l'antibiotique de façon particulière (9).

Il est de plus en plus difficile de découvrir de nouvelles classes d'antibiotiques. Au cours des 50 dernières années, seulement trois nouvelles structures moléculaires ont été introduites sur le marché. Deux de ces nouvelles classes (oxazolidinones et lipopeptides cycliques) n'ont été approuvées que pour certains cas et malgré que la platensimycine a été découverte récemment, la demande pour de nouveaux antibiotique demeure énorme (9).

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'apporter une contribution scientifique au domaine des antibiotiques en identifiant les principaux composés bioactifs des bourgeons du peuplier baumier (*Populus balsamifera*) et en évaluant leurs propriétés antibiotiques sur *S.aureus, E.coli* et le SARM. Comme objectif secondaire, les propriétés cytotoxiques de ces composés sur le carcinome du poumon (A549), l'adénocarcinome colorectal (DLD-1) et les fibroblastes normaux de la peau humaine (WS1) seront également évaluées.

2. CHAPITRE 2 - MÉTHODOLOGIE

2.1 Échantillonnage et préparation de l'extrait

L'échantillonnage des bourgeons a été effectué au parc Rivière du Moulin de Saguenay en mars 2005. Un spécimen de l'arbre a été déposé à l'herbier Louis-Marie de l'Université Laval, Québec, Canada, sous le numéro de spécimen 499 678. Les bourgeons étant naturellement visqueux, il est difficile d'estimer leur degré d'humidité. Ils ont été sécher à l'air ambiant sur une longue période (quelques jours).

Les bourgeons (875 g) ont été extraits à reflux à partir de trois concentrations différentes d'éthanol aqueux (95 %, 80% et 70%). Les bourgeons ont été extraits à trois reprises à 95% et 80% d'éthanol aqueux et seulement à deux reprises à une concentration de 70%. Les extraits ont d'abord été filtrés puis concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Par la suite, une extraction liquide-liquide avec de l'hexane et de l'eau a permis d'éliminer les produits lipophiles. Après avoir combiné les phases aqueuses des trois types d'extractions et évaporé l'eau, on obtient 284 g d'extrait.

2.2 Fractionnement primaire de l'extrait

L'extrait (284 g) a été déposé sur une colonne chromatographique contenant 2,1 kg de gel de silice. La séparation en gradient a été réalisée avec un mélange

chloroforme/méthanol comme éluant. Trois ratios différents ont été utilisés : 40:1, 15:1 et 5:1. Environ 8 L d'éluant à un ratio de 40:1 a été utilisé pour obtenir la fraction 1F. Ensuite, environ 15 L d'éluant à chacun des ratios suivant à mener aux fractions 2F et 3F.

2.2.1 Fractionnement de 2F par HPLC

La mise au point des conditions de séparation a été effectuée à l'échelle analytique. Les solvants qui ont été utilisés sont de l'eau contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et de l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Au départ, l'éluant est composé de 20% de solvant B. Après 5 minutes, le pourcentage de B est augmenté instantanément à 35% et amené par la suite à 60% en 25 minutes. Finalement, la proportion du solvant B est augmentée à 100% en 10 minutes. Le volume d'injection était de 20 μL (1mg/ml), le débit de 1 ml/min et la détection UV à une longueur d'onde de 300 nm.

La séparation à l'échelle semi-préparative a été effectuée en utilisant les mêmes solvants et les mêmes conditions d'élution déterminées à l'échelle analytique. Le débit d'élution utilisé était de 16 ml/min et le volume d'injection de 300 μL (80 mg/ml).

Sept composés ont été isolés en utilisant cette méthode de séparation et deux fractions intéressantes ont été récoltées (2F-H et 2F-J). Plusieurs de ces composés n'étaient pas suffisamment purs pour procéder à leur identification. Les composés **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** et **9** ont été purifiés plus finement en utilisant des conditions isocratiques correspondantes aux temps de rétention de chaque composé.

2.2.1.1 Purification de 2F-H

Les composés **7** et **8** ont été isolés en purifiant la fraction 2F-H. Les deux produits ont été séparés isocratiquement en utilisant un mélange 2 :1 des solvants A et B. Le débit a été de 16 ml/min et le volume d'injection de 200 µL (50 mg/ml).

2.2.2 Fractionnement de 1F

La fraction 1F (31 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 700 g de gel de silice. L'élution isocratique a été effectuée avec un mélange chloroforme/méthanol 95:5. Cette purification a permis d'obtenir six fractions. Elles ont été désignées comme 1F1, 1F2, 1F3, 1F4, 1F5 et 1F6.

La fraction 1F2 (2,1g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 200 g de gel de silice. L'élution isocratique a été réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol 120:1. Quatre fractions distinctes ont été récoltées et désignées comme 1F2-1, 1F2-2, 1F2-3 et 1F2-4.

La fraction 1F3, 1F4 et 1F5 ont été purifiées par HPLC. Les mêmes conditions de séparation mentionnées en 2.3.1 ont été utilisées. Les molécules **10** et **11** ont été isolées de la fraction 1F5, la molécule **14** a été isolée de la fraction 1F3 et les molécules **15** et **16** ont été isolées de la fraction 1F4.

2.2.3 Fractionnement de 3F

La fraction 3F (34,5 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 700 g de gel de silice. La séparation en gradient a été réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol comme éluant. Le ratio des solvants pour chaque éluant a été successivement de 12:1, 10:1, 8:1, 6:1 et 1:0. Un volume d'environ 150 ml à un ratio de 12:1 a été utilisé pour obtenir la fraction 3F1 et un volume d'environ 2 L a été utilisé pour chaque éluant suivant, menant ainsi aux fractions 3F2, 3F3, 3F4 et 3F5. La dernière fraction (3F6) a été éluée avec 100% méthanol jusqu'à ce que l'éluant récolté ne soit plus coloré.

La fraction 3F1 (1,2 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 100 g de gel de silice. La séparation en gradient a été réalisée en utilisant un mélange chloroforme/méthanol comme éluant. Le ratio des solvants pour chaque éluant a été successivement de 75:25, 65:35 et 55:45. Cette purification a permis d'obtenir sept fractions distinctes soit 3F1-1, 3F1-2, 3F1-3, 3F1-4, 3F1-5, 3F1-6 et 3F1-7.

La fraction 3F2 (8,5 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 700 g de gel de silice. La séparation en gradient a été réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol comme éluant. Un volume d'environ 600 ml à un ratio de 12:1 a été utilisé pour obtenir la fraction 3F2-1 et un volume d'environ 3 L à un ratio de 10:1 a été utilisé pour obtenir la fraction 3F2-2. La dernière fraction (3F2-3) a été éluée avec 100% méthanol jusqu'à ce que l'éluant récoltée soit limpide.

La fraction 3F3 (3,9 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 350 g de gel de silice. La séparation en gradient a été réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol comme éluant. Le ratio des solvants pour chaque éluant a été successivement de 12:1, 10:1 et 1:0. Un volume d'environ 1,5 L a été récolté pour chacune des concentrations utilisées, menant ainsi aux fractions 3F3-1, 3F3-2 et 3F3-3.

2.2.3.1 Fractionnement de la fraction 3F2-2

La fraction 3F2-2 (1,2 g) a été déposée sur une colonne chromatographique contenant 300 g d'octadecylisilane (phase inverse C18). La séparation en gradient a été réalisée avec un mélange méthanol/eau comme éluant. Le ratio des solvants pour chaque éluant a été successivement de 55:45 et 75:25. Cette purification a permis d'obtenir six fractions distinctes soit 3F2-2A, 3F2-2B, 3F2-2C, 3F2-2D, 3F2-2E et 3F2-2F.

La fraction 3F2-2B a été séparée sur une colonne HPLC semi-préparative. La séparation par a été réalisée avec une élution en gradient. L'élution a été réalisée en utilisant de l'eau acidifiée avec de l'acide formique (solvant A) et de l'acétonitrile acidifié avec de l'acide formique (solvant B). La concentration du solvant B, initialement à 25%, a progressé jusqu'à une concentration de 45% sur une période de 30 minutes. Le solvant B a par la suite ré-augmenté à 100% sur une période de 5 minutes. Le volume d'injection a été de 100 μL (100 mg/ml) et le débit de 16ml/min.

2.3 Considérations générales

2.3.1 Analyses HPLC

L'appareil HPLC analytique utilisé est un Agilent 1100 series couplé à un détecteur UV-MS. L'appareil HPLC préparatif utilisé est également un Agilent de la série 1100

couplé à un spectromètre de masse à quadripôle. Le contrôle de l'équipement, l'acquisition des données ainsi que la gestion des données chromatographiques ont été effectués par le logiciel Chemstation (Agilent). La colonne utilisée pour les séparations analytiques est une Zorbax Eclipse ODS-C18 (5µm, 4,6 x 150mm) alors que les séparations préparatives ont été réalisées avec une colonne Zorbax ODS-C18 (7µm, 21,2 x 250mm).

2.3.2 Analyses RMN

Les analyses RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance (^{1}H à 400,13 MHz, ^{13}C à 100,61 MHz) équipé d'une sonde QNP de 5mm. Les expériences effectuées étaient de deux types : 1D (^{1}H, ^{13}C, DEPT 135) et 2D (COSY, HSQC et HMBC). Les données ESI-MS haute résolution ont été acquises sur un système Applied/Biosystems/MDS Sciex QSTAR XL QqTOF MS (# de série T0970304, Toronto, Ontario, Canada).

2.4 Activité biologique

2.4.1 Condition de croissance des cultures cellulaires

Le carcinome du poumon (A549), l'adénocarcinome colorectal (DLD-1) et les fibroblastes normaux de la peau humaine (WS1) ont été obtenus de lignée cellulaire

provenant de l'«American Type Culture Collection». Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu minimum essentiel contenant des sels d'Earle et du L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA) auquel a été ajouté 10% de sérum de fœtal bovin (Hyclone), des vitamines (1X), de la pénicilline (100 I.U. ml^{-1}), de la streptomycine (100 $\mu g \cdot mL^{-1}$), des acides aminés essentiels (1X) et du sodium pyruvate (Mediatech cellgro, VA). Les cellules ont été gardés à 37°C dans un environnement à humidité contrôlée contenant 5% CO_2.

2.4.2 Analyses cytotoxiques

Les cellules se sont multipliées exponentiellement sur une microplaque contenant 96 puits (BD-Falcon) à une densité de 5 X 10^3 cellules par puits dans 100 µL de milieu de culture (DMEM avec 10% SVF) et ont été conditionnées 24 heures avant de procéder au traitement. Chaque composé a été ajouté (100 µL par puits, MeOH ou DMSO) à des concentrations progressives et les cellules ont été incubées pendant 48 heures. La concentration finale de MeOH ou de DMSO dans le milieu de culture a été maintenue à 0,25 % (v/v) afin d'éviter une toxicité liée au solvant. La cytotoxicité a été déterminée en utilisant la résazurine (32) et les plaques ont été analysées avec un fluorimètre Fluoroskan Ascent F1™ automatisé (Labsystems) utilisant l'excitation et l'émission à des longueurs d'ondes respectives de 530 et 590 nm. La fluorescence était proportionnelle à l'activité métabolique cellulaire dans chaque puits. Le pourcentage de survie a été défini par la fluorescence expérimentale des puits comparés à celle des puits de contrôle après la

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

soustraction des valeurs de blanc. Chaque expérience à était réalisée en triplicata. Les valeurs IC_{50} exprimées sont la moyenne de chaque expérience ± la déviation standard.

2.4.3 Analyses antibactériennes

L'activité antibactérienne a été évaluée avec la méthode de micro dilution (33) avec quelques modifications : les bactéries se sont multipliées sur une microplaque contenant 96 puits (BD-Falcon) à une densité de 5 X 10^3 *E. coli* (ATCC 25922) ou 40 X 10^3 *S. aureus* (ATCC 25923) par puits dans 100 µL de mélange de nutriment (Difco). La concentration d'éthanol dans le milieu de culture a été maintenue à 0.25 % (v/v) afin d'éviter la toxicité liée au solvant. Un volume de 50 µL d'une solution contenant 4% de résazurine a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 6 heures. La fluorescence a été mesurée après 6 heures sur un lecteur de plaque Fluoroskan Ascent F1™ automatisé de 96 puits (Labsystems) utilisant l'excitation et l'émission à des longueurs d'ondes respectives de 530 et 590 nm.

2.4.4 Tests d'activité sur SARM

L'évaluation de l'activité antibactérienne sur le SARM a été réalisée selon la méthode décrite en 2.4.3 Les souches de SARM ont été fournies par le Complexe hospitalier de la Sagamie (*Staphylococcus aureus* 14094, 14108, 14118 et Wild Type).

2.4.5 Diffusion du disque

L'évaluation antibactérienne de l'extrait initial a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque (34). Les bactéries ont été inoculées sur gel d'agar Mueller-Hinton (Fluka) qui a ensuite été inoculé avec la solution bactérienne en utilisant une tige de coton. Un milligramme d'extrait éthanolique de bourgeon a été dissout dans 20 μL de DMSO, placé sur un disque de fibre de verre de 6 mm de diamètre (Difco) et celui-ci a été déposé sur la surface d'agar inoculée. Des disques imprégnés de DMSO (20 μL) et de chloramphénicol (30 μg), servant respectivement de témoin négatif et de témoin positif, ont aussi été déposés sur la surface de gélose inoculée. Les pétris ont ensuite été incubés à 37°C pendant 18 heures. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

3. CHAPITRE 3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Extraction des produits naturels des bourgeons

L'activité antibactérienne d'un extrait éthanolique de bourgeons de *Populus balsamifera* a été évaluée par la méthode de diffusion de disque. L'activité antibactérienne sur *S. aureus* a été significative avec une inhibition de 13,2 mm. Par comparaison, un standard de 30 µg de chloramphénicol (un antibiotique de la famille des phénicolés) provoque une zone d'inhibition de 22,3 mm. L'isolation des molécules a donc été orientée en fonction de l'activité antibactérienne sur *S. aureus*. Une évaluation de la cytotoxicité a également démontrée que l'extrait éthanolique des bourgeons avait également une influence sur les cellules cancéreuses (tableau 1). Cette activité a également été évaluée tout au long du processus d'isolation.

Tableau 1 : Rendements et activités biologiques des premières fractions de l'extrait

	Poids (g)	**Rendement (%)**	**A549 (µg/ml)**	**DLD-1 (µg/ml)**	**WS1 (µg/ml)**	***S.aureus* (µg/ml)**	***E.coli* (µg/ml)**
Extrait	284	32,5[a]	19 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	N/D	N/D
1F	31,3	11,0[b]	28 ± 2	26 ± 2	20 ± 1	12 ± 2	100 ± 100
2F	70,2	24,7[b]	16 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	0,16 ± 0,04	≥ 160
3F	39,3	13,8[b]	103 ± 5	150 ± 9	82 ± 3	14 ± 3	≥ 160

a = Rendement calculé à partir des bourgeons (875 g)
b = Rendement calculé à partir de l'extrait brut (284 g)

L'éthanol a été choisi comme solvant d'extraction en raison de sa relative innocuité et parce que les polyphénols, composés majoritaires dans les bourgeons du peuplier baumier (9), sont solubles dans ce solvant. Afin d'extraire une grande variété de composés,

la concentration d'éthanol a été abaissée jusqu'à 70 % pour extraire les composés ayant une plus grande solubilité dans l'eau. Une extraction liquide-liquide avec de l'eau et de l'hexane a permis de retirer les produits lipophiles comme les acides gras de l'extrait de départ. La fraction hexane a été jugée inactive selon les résultats des tests d'activité. Les extractions effectuées et le traitement mise au point pour retirer les composés lipophiles ont conduit à l'obtention de 284 g d'extrait correspondant à un rendement de 32.5 %.

3.2 Fractionnement de l'extrait brut et évaluation de l'activité biologique des fractions

Suite à la séparation, 1F (31,2 g) représente 11,0 % de la masse initiale, 2F (70,2 g) 24,7 % et 3F (39,3 g) 13,8%. Ces trois fractions représentent donc 48,5 % de l'extrait. Ce faible rendement est en partie attribuable à l'adsorption irréversible des composés très polaires sur le gel de silice. En effet, la coloration brunâtre encore visible sur la colonne, malgré plusieurs rinçages au méthanol, indique la présence de composés ayant une grande affinité avec la silice.

Sur la base des résultats aux tests bioactifs et de l'information préliminaire sur la composition des matrices (HPLC-MS et CCM), la fraction 2F a été notre premier choix pour être investiguée davantage. Cette fraction montre une forte activité contre *S. aureus* (tableau 1). En utilisant les mêmes critères de sélection, la fraction 1F a été choisie en

Rapport-Gratuit.com

second pour être étudiée. Le fractionnement de la fraction 3F a été confié en partie à un étudiant en projet de fin d'études du baccalauréat en chimie.

3.2.1 Fractionnement de 2F par HPLC

Plusieurs composés de la fraction 2F ont été isolés par HPLC. La méthode HPLC mise au point a permis de détecter 13 pics bien séparés (figure 5). Plusieurs des composés correspondant à ces pics ont été isolés et caractérisés. En raison des conditions de séparation et de l'appareillage disponible, seulement 600 mg des 70,2 g de la fraction 2F ont été injectés sur HPLC semi-préparatif. Sept molécules (**1-6, 9**) ont été isolées de cette fraction.

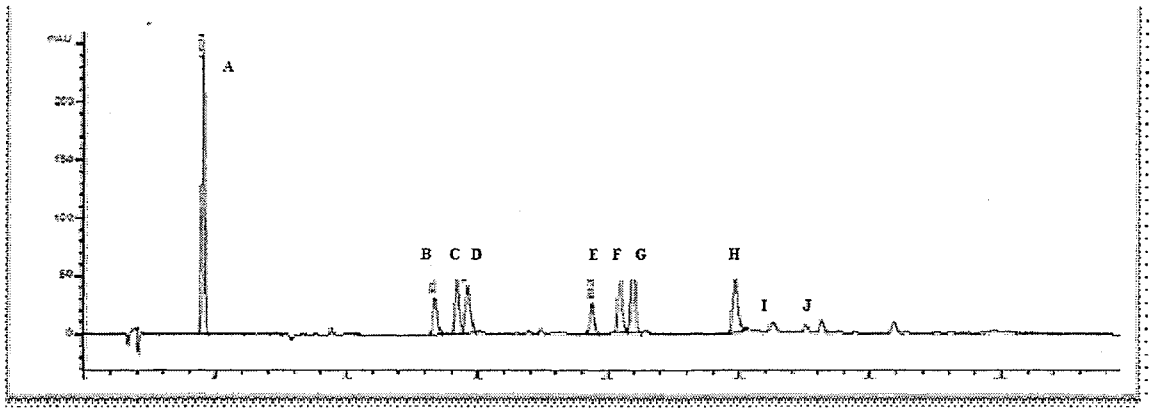


Figure 5 : Chromatogramme HPLC de la fraction 2F

3.2.1.1 Fractionnement de 2FH

Pour séparer les deux composés contenus dans 2FH, l'acétonitrile a été remplacé par le méthanol afin de modifier l'affinité de la phase mobile avec les deux produits du mélange. Le temps de séparation est plutôt long (120 minutes) mais il permet tout de même d'atteindre l'objectif fixé. Dans le but d'économiser temps et solvant, l'élution isocratique a été optimisée. Comme les deux molécules ciblées sont récoltés à partir de la 80ième minute jusqu'à la 110ième, il est possible de diminuer le temps d'attente de moitié en injectant 2FH aux 60 minutes (figure 6). Le pic du produit **7** chevauche légèrement le pic du produit **8**. Trois fractions ont été récoltées : **7**, **8** et **7+8**. Après évaporation du solvant, il est possible de réinjecter **7+8** afin de les séparer à nouveau. Au final, 8 mg de **7** (rendement de 23%) et 7 mg de **8** (rendement de 20%) ont été récoltés.

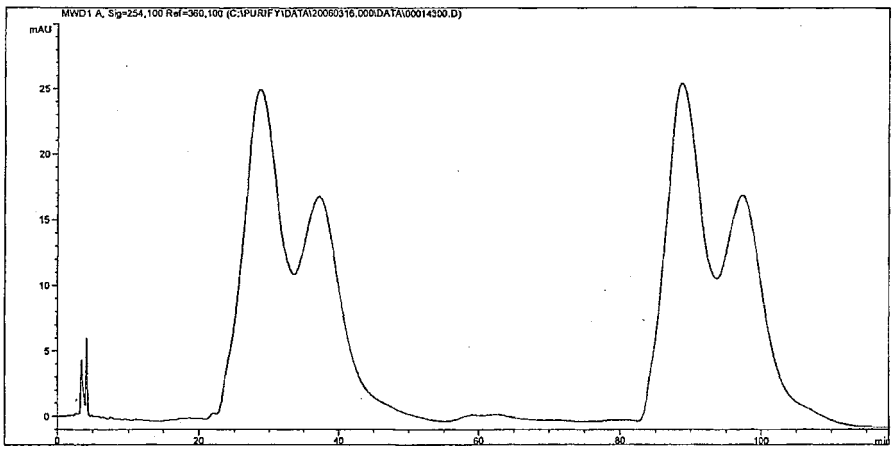


Figure 6 : Chromatogramme HPLC de la fraction 2FH

3.2.2 Fractionnement de 1F

La séparation sur colonne chromatographique de 31,3 g de 1F a permis d'obtenir six nouvelles fractions (rendement de 81,5%). Les fractions ont été soumises au HPLC-MS afin d'obtenir un aperçu de chacune des matrices. Les tests effectués sur les fractions 1F1, 1F2 et 1F6 étaient particulièrement intéressants sur la bactérie *S.aureus*, ayant une activité inférieure à 5,3 µg/ml (tableau 2). Le composé **14** a été isolé dans la fraction 1F3 et les composés **15** et **16** dans la fraction 1F4.

Tableau 2: Masses, rendements et activités biologiques des fractions issues de 1F

Fraction	Masse (g)	Rendement (%)	A549 (µg/ml)	DLD-1 (µg/ml)	WS1 (µg/ml)	*S.aureus* (µg/ml)
1F1	3,5	11,2	4,6 ± 0,3	5,1 ± 0,3	6,4 ± 0,6	3,3 ± 0,6
1F2	2,1	6,7	13,3 ± 0,8	10,0 ± 0,3	12 ± 1	5,3 ± 0,2
1F3	4,7	15,0	35 ± 3	36 ± 2	19 ± 5	16,2 ± 0,7
1F4	3,2	10,2	19 ± 3	35 ± 2	34 ± 6	14 ± 2
1F5	5,9	18,8	11 ± 2	26 ± 2	31 ± 5	16 ± 2
1F6	6,1	19,5	29 ± 4	43,1 ± 0,7	43 ± 5	4,9 ± 0,5

3.2.2.1 Fractionnement de 1F2

La fraction 1F2 (2,1g) a été séparée en quatre parties. L'analyse HPLC-MS a démontré que cette fraction comporte des molécules communes aux fractions 1F1 à 1F4. Selon le chromatogramme, plusieurs composés sont isolables à partir de la méthode utilisée pour 2F. En raison des faibles quantités obtenues (tableau 3) et en l'absence de donnée sur

les activités biologiques, seule la fraction 1F2-3 a été purifiée davantage. Deux molécules (**12** et **13**) ont été isolées.

Tableau 3: Masses, et rendements des fractions issues de 1F2

Fraction	Masse (g)	Rendement (%)
1F2-1	0,3	14,3
1F2-2	0,3	14,3
1F2-3	1,0	47,6
1F2-4	0,2	9,5

3.2.2.2 Fractionnement de 1F5 par HPLC

La méthode HPLC établie pour 2F a été appliquée à la fraction 1F5 pour vérifier si certains produits était contenus dans les deux fractions. L'analyse a révélée que cette fraction est constituée de trois composés majoritaires (figure 7) et que ces molécules peuvent être isolées avec cette méthode. Les composés **10** et **11** ont été isolés respectivement des pics A et B.

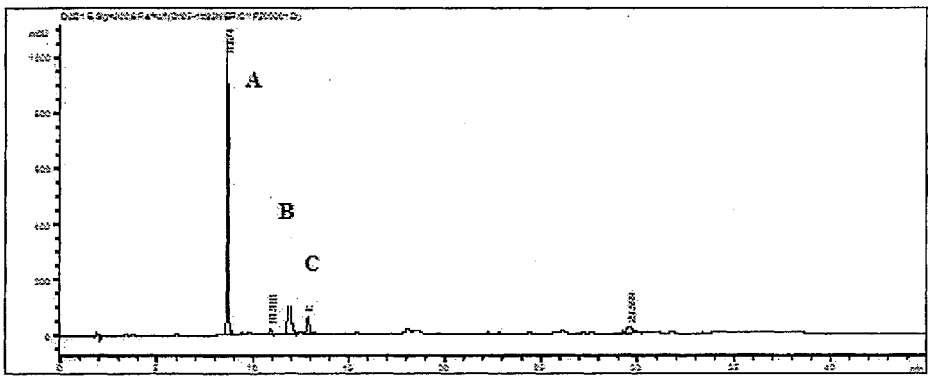


Figure 7 : Chromatogramme HPLC de 1F5

3.2.3 Fractionnement de 3F

La fraction 3F a été purifiée sur colonne chromatographique. Six nouvelles fractions ont été obtenues (74 %). Les fractions 3F1 à 3F4 ont un effet significatif sur *S.aureus* avec des valeurs IC_{50} entre 2,7 et 35 µg/ml (tableau 4). Les autres fractions ont une toxicité faible ou inexistante sur les cellules testées ainsi que sur *Escherichia coli.*

Tableau 4: Masses, rendements et activités sur *S.aureus* des fractions de 3F

Fraction	Masse (g)	Rendement (%)	*S.aureus* (µg/ml)
3F1	1,3	3	15 ± 2
3F2	8,5	22	2,7 ± 0,4
3F3	4,0	10	9 ± 1
3F4	6,6	17	35 ± 3
3F5	4,2	11	> 100
3F6	4,3	11	> 100

3.2.3.1 Fractionnement de 3F2

La fraction 3F2 a été séparée sur colonne chromatographique. Trois nouvelles fractions ont été obtenues (91 %). Une analyse sur HPLC-MS révèle que les fractions 3F2-1 et 3F2-3 contiennent encore plusieurs composés tandis que 3F2-2 est une fraction relativement purifiée avec un seul pic majoritaire (figure 8). De plus, 3F2-2 est disponible en quantité suffisante pour procéder à une séparation sur colonne chromatographique. Elle a donc été choisie pour être investiguée davantage. Aucun test biologique n'a été effectué sur les fractions récoltées.

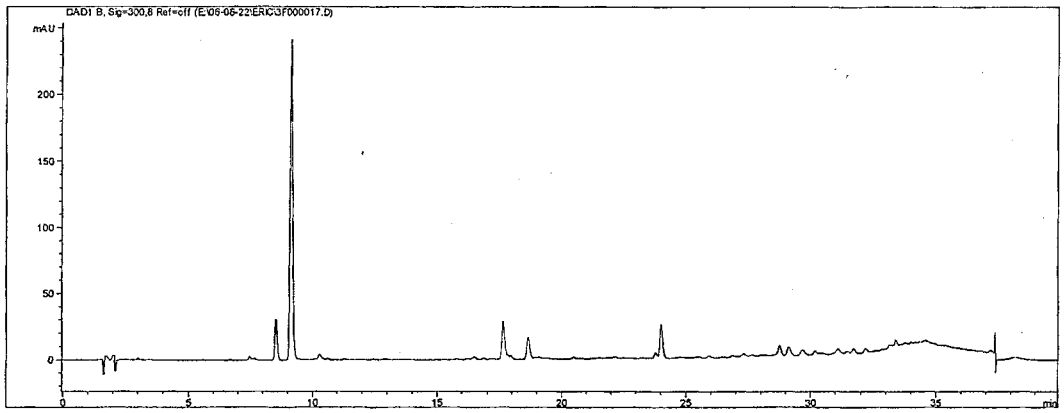


Figure 8 : Chromatogramme HPLC de la fraction 3F2-2

3.2.3.1.1 Fractionnement de 3F2-2

La séparation sur colonne chromatographique avec les solvants habituels (chloroforme/méthanol) n'a pas très bien fonctionnée sur cette fraction. Des tests sur CCM avec différents types d'éluant ont été effectués afin de trouver de nouvelles conditions de séparation. D'après les résultats, une séparation sur octadecylsilane (phase inverse C18) avec un mélange eau/méthanol comme éluant est la meilleure solution. Six nouvelles fractions ont été recueillies pour un rendement de 89 %. D'après le chromatogramme HPLC-MS, la fraction 3F2-2B contient les produits majoritaires observés dans la fraction 3F2-2. Les molécules **17** (pic 3) et **18** (pic 4) ont été isolées de cette fraction (figure 9).

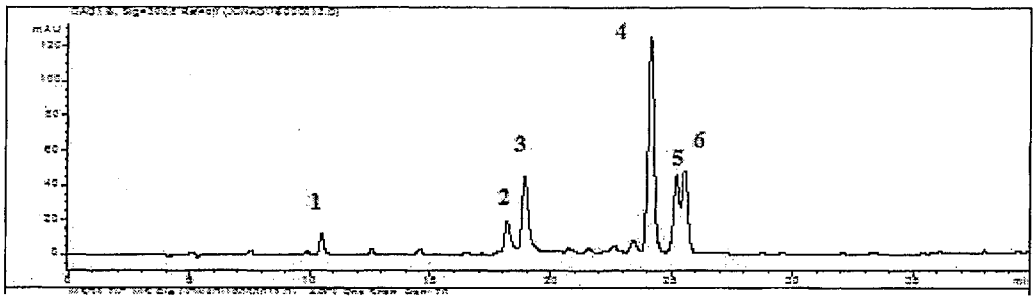


Figure 9 : Chromatogramme HPLC de 3F2-2B

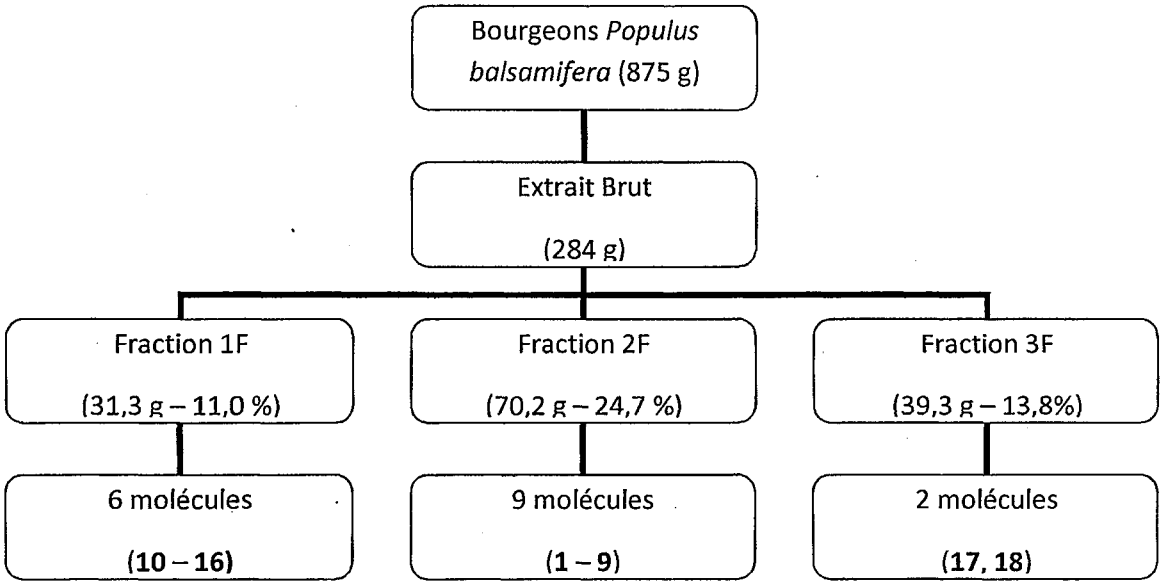


Figure 10 : Récapitulatif du fractionnement des bougeons

3.3 Identification des composés isolés

3.3.1 Acides phénoliques (1, 10)

Le composé **1** a été isolé de la fraction 2F (pic A, figure **5**) avec un rendement de 7,0 %. Ce composé a été identifié comme étant l'acide coumarique (figure 11), un acide phénolique commun dans le genre *Populus*. En RMN ^{1}H, les deux doublets d'une intégration de 2H (6,83 et 7,45 ppm) indiquent que le cycle aromatique est substitué en *para*. La constante de couplage des protons oléfiniques (15,8 Hz) suggère que la liaison double est de géométrie *trans*.

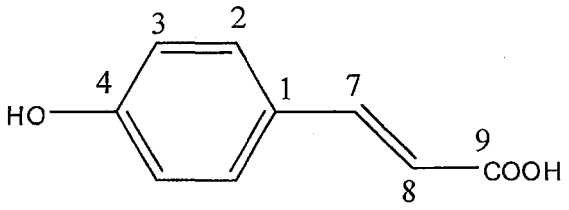


Figure 11 : Acide coumarique (**1**)

Le composé **10** a été isolé de la fraction 1F5 (pic A, figure 7) avec un rendement de 52 %. L'analyse RMN a rapidement permis d'identifier l'acide cinnamique (figure 12). Le ratio m/z de 148 est conforme avec cette structure molécule. Ce composé a déjà été répertorié dans cette espèce (10).

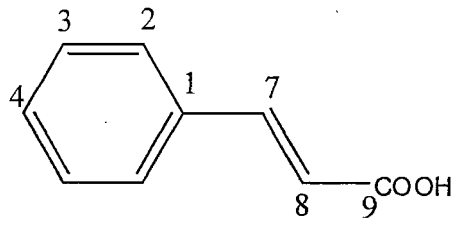


Figure 12 : Acide cinnamique (**10**)

Ces deux acides n'ont pas été isolés dans la même fraction en raison de la différence de polarité engendrée par la présence du groupement hydroxyle en position 4, l'acide cinnamique étant moins polaire.

3.3.2 Dihydrochalone (2-3, 11-13, 18)

Le composé **2** a été isolé de la fraction 2F (pic C, figure 5) avec un rendement de 8,3 %. L'analyse attentive du spectre RMN ^{1}H révèle la présence de 3 signaux correspondant à des protons aromatiques (6 protons), de deux signaux correspondant à des groupes méthylènes ainsi qu'à un signal correspondant à un groupe méthoxyle. L'inspection du spectre 13C en combinaison avec l'information obtenu des spectres ^{1}H et HSQC révèle la présence de 16 carbones sur la molécule : un carbone méthoxyle, deux carbones méthylènes, 6 carbones aromatiques tertiaires, 6 carbones aromatiques quartenaires (dont quatre oxygénés) et un carbone cétonique. À ce stade, il est possible d'envisager que la structure du produit s'apparente à une dihydrochalcone. La position du

groupement OCH_3 a été déterminée à partir de la corrélation HMBC entre les protons du groupe méthoxyle avec le carbone aromatique oxygéné en position 4. La molécule a été identifiée, il s'agit du 2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone (figure 13). Cette molécule a déjà été identifiée dans l'espèce (19).

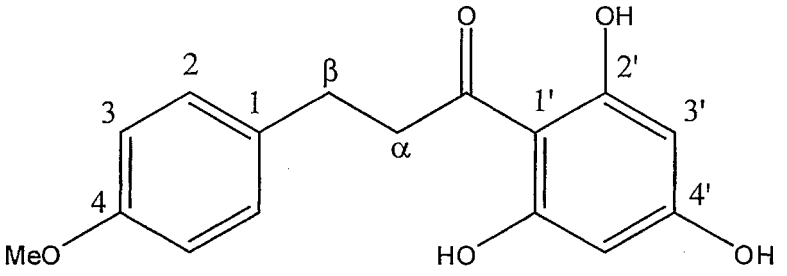


Figure 13 : 2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone (**2**)

Le composé **3** a également été isolé de la fraction 2F (pic D, figure **5**). Les données spectrales de RMN du composé **3** montrent une grande similitude avec celles du composé **2** mise à part l'absence du signal correspondant au groupement méthoxyle en position 4. La molécule a donc été identifiée comme étant le 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (figure 14). Le composé **3** a déjà été identifié dans le *Populus trichocarpa* (35).

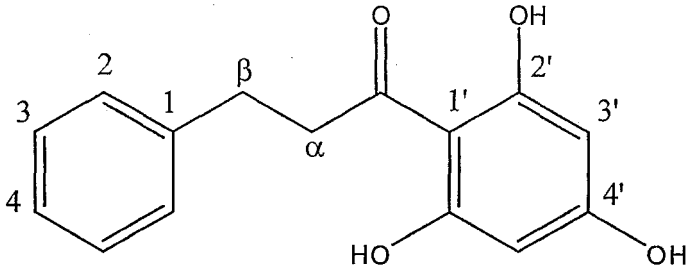


Figure 14 : 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (**3**)

Le composé **11** a été isolé de la fraction 1F5 (pic B, figure 7) avec un rendement de 26 %. La seule différence structurale de cette dihydrochalcone avec la molécule **2** provient du groupement méthoxyle dont les protons corrèlent en HMBC avec le carbone aromatique oxygéné situé en position 4' plutôt qu'en 2'. Cette molécule, le 2',4,6'-trihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone (figure 15), a également été répertoriée dans le peuplier baumier (19).

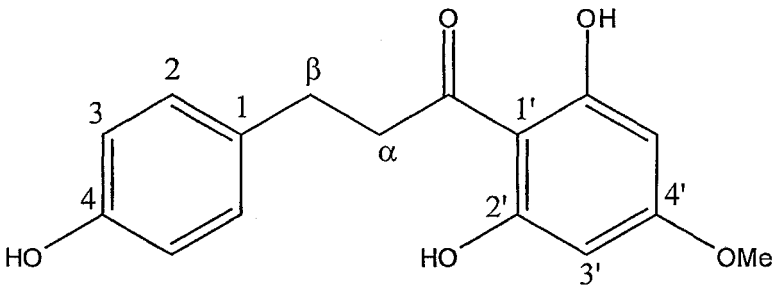


Figure 15 : 2',4,6'-trihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone (**11**)

Les composés **12** et **13** ont été isolés de la fraction 1F2-3 avec des rendements respectifs de 8,5 % et de 6,6 %. Une comparaison des spectres RMN démontre que les molécules isolées sont toutes deux des dihydrochalcones quasi-identiques. Le groupement

OCH_3 en position 4' des deux molécules est probablement responsable de la différence de polarité entre les dihydrochalcones isolées précédemment. Le composé **12** possède un deuxième groupement méthoxyle qui est assignable par RMN. En effet, l'intégration, le déplacement chimique et la multiplicité des protons (3,73 ppm [s], 3H et 3,75 ppm [s], 3H) indique clairement, pour les deux signaux, un carbone primaire lié à un oxygène. De plus, malgré l'excellente résolution de l'appareil, l'expérience HSQC ne permet pas d'assigner précisément les carbones correspondant aux hydrogènes mentionnés ci-dessous, leurs déplacements chimiques étant juxtaposés sur le spectre. Heureusement, comme les deux groupements en question sont identiques (OCH_3), l'extrapolation des informations obtenu permet tout de même d'identifier la molécule. Le composé **12** a été identifié comme étant le 2'6'-dihydroxy-4,4'-diméthoxydihydrochacone (figure 16) et le composé **13** comme étant le 2'6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochacone (figure 17). Ces deux molécules sont répertoriées dans le *Populus balsamifera* (19).

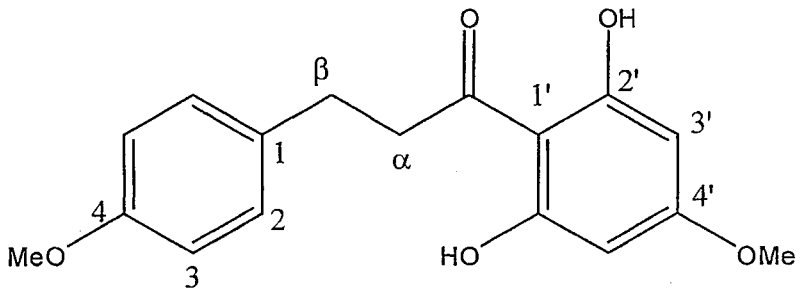


Figure 16 : 2',6'-dihydroxy-4,4'-diméthoxydihydrochalcone (**12**)

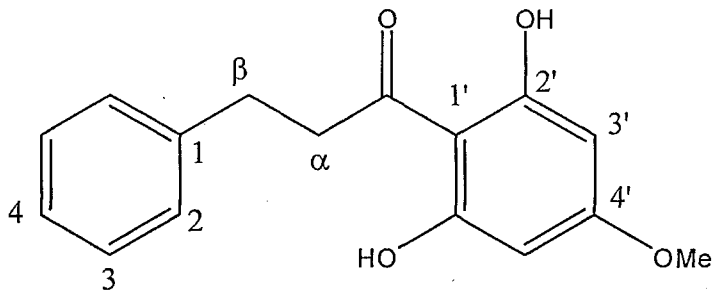


Figure 17 : 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone (**13**)

La dernière dihydrochalcone a été isolée de la fraction 3F2-2B (pic 4, figure 9) Le composé **18**, le 2',4',6',4 – tétrahydroxydihydrochalcone (figure 18), également connu sous le nom de phlorétine. Cette molécule est différente de ses homologues par ses quatre groupements fonctionnels qui sont tous des hydroxyles. La phlorétine est déjà répertoriée dans le peuplier baumier (19).

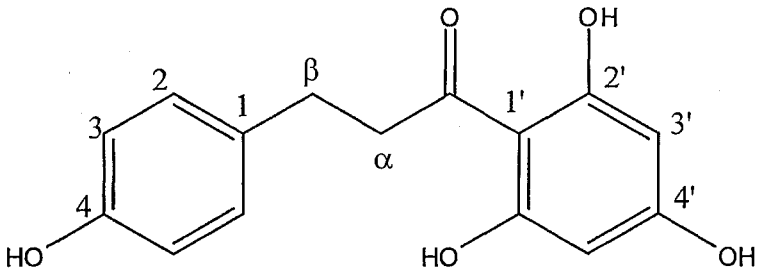


Figure 18 : Phlorétine (**18**)

3.3.3 Balsacone (4, 5 et 6)

Les composés **4**, **5** et **6** ont été isolés de la fraction 2F (pic E-G, figure **5**) avec des rendements respectifs de 3,7 %, 5,7 % et 3,0 %.

L'analyse des spectres RMN (tableau 5) du composé **4** révèle que le squelette de base est similaire à une chalcone. On peut d'abord déceler la présence d'un premier cycle aromatique avec deux substituants situés en *para* (C1 à C6). En effet, les signaux de RMN ^{1}H en position 2 (7,05 ppm) et en position 3 (6,69 ppm) apparaissent sous la forme de doublets intégrants pour 2H et une corrélation COSY permet de confirmer qu'ils sont sur des carbones voisins. Le carbone C4, déterminé grâce à sa corrélation HMBC avec le proton C2, est un carbone quaternaire aromatique oxygéné (δ ^{13}C = 156,5 ppm). Le proton en C2 montre aussi une corrélation HMBC avec un carbone aromatique quaternaire possédant un déplacement chimique de 134,0 ppm (C1). Ce dernier est lié à une chaîne aliphatique constitué des protons α et β puisque le proton de C2 corrèle en HMBC avec le carbone Cβ. Les carbones α et β sont voisins puisqu'ils corrèlent en COSY et sont des carbones secondaires selon l'analyse DEPT 135. Une fonction carbonyle termine cette chaîne selon le spectre en HMBC et ce carbonyle est relié au carbone α car le signal de ses protons est le plus déblindé (3,31 ppm). L'analyse du cycle centrale démontre qu'un seul des six carbones est lié à un hydrogène (C5', 91,2 ppm). La position des différents signaux sur le cycle central ont été assignés grâce aux corrélations HMBC. C1' s'aligne faiblement aux signaux ^{1}H de Cα et C5' ce qui confirme que la chaîne formée du carbonyle, des deux méthylènes et du cycle aromatique substitué en *para* est liée au cycle central sur le carbone C1'. Le proton situé sur C5' corrèle avec deux carbones aromatiques oxygénés (162,4 ppm, 165,1 ppm) qui se retrouve donc de part et d'autre de C5'. La corrélation de C9'' (3,36 ppm) avec le carbone à 165,1 ppm permet d'assigner ce signal à C4' et par conséquent d'assigner le signal à 162,4 ppm à la position C6'. L'hydrogène en 9'' est le

seul à entrer en interaction avec les carbones à 164,0 ppm (position C2') et à 107,7 ppm (position C3'). La chaîne de carbone C9'' à C7'' est visible avec l'expérience COSY. Les signaux ^{1}H de C7'' et C8'' sont très déblindés et possèdent une fréquence de 15,6 Hz, ce qui est caractéristique d'un alcène de type trans. La caractérisation du dernier cycle s'effectue de la même façon que le premier cycle. Les différences entre chaque balsacone sont au niveau de la nature des groupements fonctionnels en C4, C4' et C6'. Ces fonctions sont des alcools, des hydrogènes ou des méthoxyles.

Tableau 5: Assignation des signaux RMN (400 MHz) ^{1}H et ^{13}C de la balsacone A dissous dans 1 ml de chloroforme deutéré ($CDCl_3$) avec 1% de TMS.

Positions	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	134,0	-
2, 6	130,4	7,05 [d - 8,3]
3, 5	116,2	6,69 [d – 8,3]
4	156,5	-
β	31,5	2,87 [t – 8,2]
α	47,7	3,31 [m]
CO	207,1	-
1'	105,8	-
2'	164,0	-
3'	107,7	-
4'	165,1	-
5'	91,2	6,04 [s]
6'	162,4	-
1''	131,2	-
2'', 6''	128,1	7,11 [d – 8,5]
3'', 5''	116,2	6,66 [d – 8,5]
4''	157,4	-
7''	130,3	6,23 [d - 15,6]
8''	126,6	6,05 [dt – 15,6 / 6,3]
9''	26,4	3,36 [m]
OCH_3	56,1	3,84 [s]

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

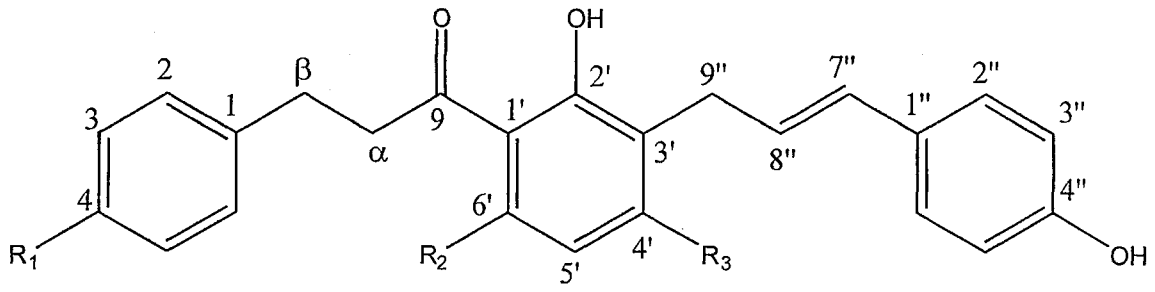
Le composé **4** a été identifié comme étant le 2',4,6'-trihydroxy-(3'-(4-hydroxycinnamyl))-4'-méthoxydihydrochalcone (figure 19). Ce composé est un solide amorphe et orange ayant un rapport *m/z* de 420.

Le composé **5** a été identifié comme étant le 2',4,4'-trihydroxy-(3'-(4-hydroxycinnamyl))-6'-méthoxydihydrochalcone (figure 19). La structure chimique de ce composé amorphe est différente de celle de **4** par la permutation des groupements fonctionnels en C4' et C6'. La spectrométrie de masse confirme cette ressemblance avec un rapport *m/z* identique.

Le composé **6** a été identifié comme étant le 2',4',6'-trihydroxy-(3'-(4-hydroxycinnamyl))-dihydrochalcone (figure 19). Cette molécule a également une structure similaire aux composés **4** et **5**. Ce solide amorphe et orangé se distingue par son poids moléculaire inférieur (rapport *m/z* 390) qui s'explique par l'absence d'un groupement OCH_3. De plus, une expérience COSY permet de déterminer que le premier cycle est monosubstitué.

Selon nos recherches, ces composés n'ont jamais été rapportés dans la littérature scientifique. Nous avons proposé le nom "balsacone" pour cette nouvelle classe

moléculaire. Les molécules **4**, **5** et **6** ont donc été nommées respectivement balsacone A, balsacone B et balsacone C.



Balsacone A	$R_1 = OH$	$R_2 = OH$	$R_3 = OCH3$
Balsacone B	$R_1 = OH$	$R_2 = OCH3$	$R_3 = OH$
Balsacone C	$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = OH$

Figure 19 : Balsacones A, B et C (**4**, **5** et **6**)

3.3.4 Composés 7-9

Visuellement, le pic H de la fraction 2F semble pur et facilement isolable avec un temps de rétention de 24,8 minutes (figure 5). Cependant, l'analyse RMN a révélé que ce pic est en fait composé de deux produits. Ces deux composés ont des structures chimiques quasi-identiques, à l'exception d'un groupement fonctionnel. En effet, l'intensité, les valeurs d'intégration et les déplacements chimiques de certains signaux ne correspondaient pas lors de l'analyse des spectres ^{1}H et ^{13}C. Par exemple, une valeur d'intégration de 1,5 H a été observée pour un signal provenant d'un OCH_3. Une étape d'isolation additionnelle sur HPLC semi-préparatif a donc été nécessaire pour séparés les composés **7** et **8**.

L'analyse des spectres RMN de **7**, **8** et **9** a été complexe. La présence de trois cycles aromatiques pouvant être substitués en *para* a compliqué l'identification des molécules car certains signaux se juxtaposaient. L'analyse spectrale du composé **8** (tableau 6) sera discutée dans le paragraphe suivant mais les trois molécules peuvent être élucidées avec le même raisonnement.

Les positions 2 et 6 de la plupart des cycles aromatiques ont un déplacement chimique de 127 ± 3 ppm en ^{13}C, de 156 ± 3 ppm en position 4 et de 114 ± 3 ppm en position 3 et 5. Ces déplacements chimiques démontrent une substitution en *para.* Une expérience HMBC permet d'observer la présence ou non d'un méthoxyle comme groupement fonctionnel. En effet, lorsque le signal ^{1}H du méthoxyle (~ 3,8 ppm, [s]) est aligné aux signaux ^{13}C du carbone 4, on peut confirmer la présence d'un groupement OCH_3. Les carbones C2, C3, C4, C7'', C8'' et C9'' sont liés à au moins un atome d'hydrogène (voir tableau 6). Une analyste COSY permet d'observer une corrélation entre tous ces atomes et d'élucider un segment de six carbones hydrogénés. La liaison double entre 7'' [$\delta^{1}H$ = 6,21 ppm] et 8'' [$\delta^{1}H$= 5,89 ppm] est trans [J = 15,6 Hz]. Le déplacement chimique du carbone 9''' est de 205,3 ppm et il n'est lié à aucun proton, on peut donc déduire qu'il s'agit d'un carbonyle. Cette carbonyle corrèle en HMBC avec les protons de C8''' (3,00 ppm, 3,11 ppm). Une expérience COSY permet de confirmer que C8''' et C7''' sont des atomes voisins et une expérience DEPT 135 démontre que ce sont des

carbones secondaires. Une analyse HMBC démontre que le carbone 4a complète le segment composé de C3 et C4 et que le carbone 2 est relié au carbone 1'. Les corrélations HMBC des protons en position 4 avec le signal à 102,1 ppm permettent d'assigner ce signal au carbone aromatique quaternaire 4a. La partie la plus critique de l'assignation se situe au niveau des carbones quaternaires aromatiques aux positions 5, 7, 8 et 8a. Pour y arriver, les corrélations HMBC du proton en position 6 ont été utilisées pour déterminer deux possibilités pour les carbones en position 5 et 7, soit les signaux à 165,1 et 163,9 ppm. Les corrélations HMBC des protons en position 4 avec les signaux à 163,9 et 157,3 ppm permettent d'assigner 163,9 ppm au carbone 5. On peut ensuite conclure que le signal à 157,3 ppm correspond au carbone 8a et que celui à 165,1 ppm au carbone 7. Ne reste plus que le signal à 104,7 ppm qui ne peut correspondre qu'au carbone 8. Le seul carbone quaternaire disponible pour lier le carbone C9''' est le carbone 8, ce qui vient compléter l'élucidation de la structure chimique.

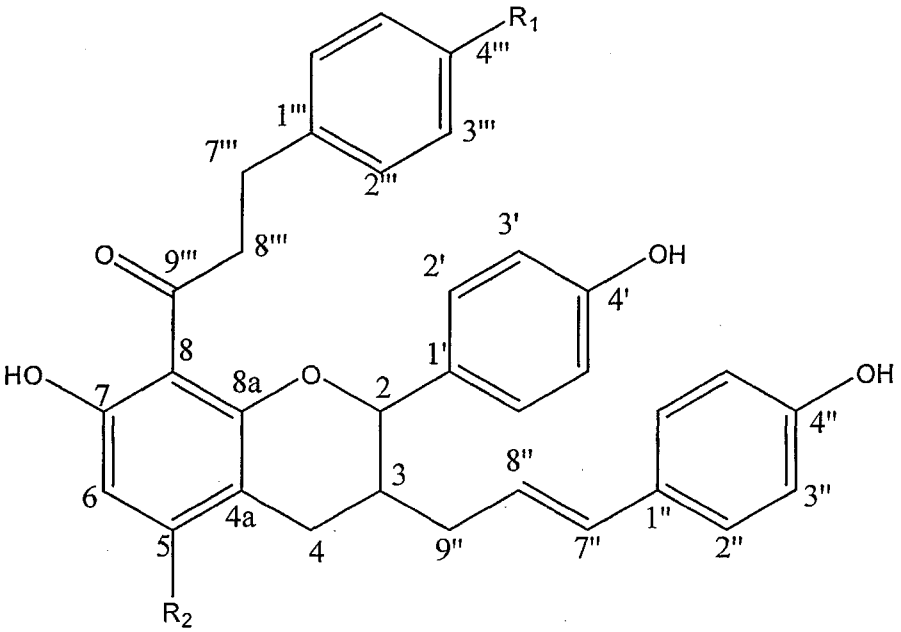
Les composés **7** et **8** pourraient être décrits comme étant une afzelechine greffée de deux phénylpropènes en position 3 et 8. Le composé **7** (figure 20) possède un ratio m/z de 522 et n'a jamais été identifié dans la communauté scientifique selon la littérature consultée. Il est différent de son homologue par l'absence d'un groupement méthoxyle en position 4'''.

Le composé **8** (figure 20) possède un ratio masse sur charge de 552. Une fois l'élucidation de la structure chimique effectuée, une recherche dans la littérature à permis de découvrir que cette molécule avait déjà été isolée dans l'I*ryanthera laevis* (36).

Tableau 6: Assignation des signaux RMN (400MHz) ^{1}H et ^{13}C du composé 8 dissous dans 1 ml de chloroforme deutéré ($CDCl_3$) avec 1% TMS

Positions	**^{13}C (ppm)**	**^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]**
2	83,5	4,65 [d - 9,3]
3	37,0	2,16
4	25,2	2,83; 2,26
4a	102,9	-
5	163,9	-
6	91,5	6,07
7	165,1	-
8	104,7	-
8a	157,3	-
1'	129,9	-
2', 6'	128,7	7,29
3', 5'	115,1	6,85
4'	157,6	-
1''	129,2	-
2'', 6''	126,9	7,15
3'', 5''	114,8	6,70
4''	156,4	-
7''	131,6	6,21 [d – 15,6]
8''	123,3	5,89
9''	35,3	2,11; 1,91
1'''	131,8	-
2''', 6'''	128,6	6,52
3''', 5'''	114,5	6,56
4'''	154,7	-
7'''	29,7	2,67
8'''	45,4	3,11; 3,00
9'''	205,3	-
OCH_3	54,9	3,81 [s]

Le composé **9** (figure 20) a été isolé de la fraction 2F (pic I, figure 5) avec un rendement de 4,7 %. L'analyse RMN permet d'observer qu'un groupement OCH_3 est lié au carbone 5 et que les trois cycles aromatiques ont tous un groupement hydroxyle en position *para*. Ce composé amorphe et orangé possède également un ratio *m/z* de 552. La comparaison des spectres de fragmentation de **8** et **9** indique clairement un changement de position du méthoxyle par le transfert d'une masse de 14 entre deux spectres. Selon nos recherches, cette molécule n'a jamais été répertoriée dans la littérature.



Composé 7: $R_1 = H$ $R_2 = OH$
Composé 8: $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OH$
Composé 9: $R_1 = OH$ $R_2 = OCH_3$

Figure 20 : Composés 7, 8 et 9

3.3.5 Flavonoïdes (14-17)

Le composé **14** a été isolé de la fraction 1F3 avec un rendement de 35 %. Le produit isolé était accompagné de quelques impuretés, ce qui compliqua l'analyse RMN. Cependant, les corrélations en COSY, HSQC et HMBC permettent de dissocier les signaux résiduels de ceux du composé. On peut déterminer que le groupement phényle en retrait est monosubstitué grâce à la multiplicité observée pour les signaux aromatiques sur le spectre RMN ^{1}H (un doublet, deux triplets) et aux corrélations COSY entre ces signaux aromatiques. La fonction carbonyle sur C4 est représentée par un déplacement chimique de 197,2 ppm en ^{13}C et on remarque la présence de deux carbones aromatiques oxygénés (168,3 et 165,4 ppm) qui ont été associés à des fonctions phénols en C5 et C7. Le pinocembrin (figure 21) a été identifié et il est déjà répertorié dans *Populus balsamifera* (10).

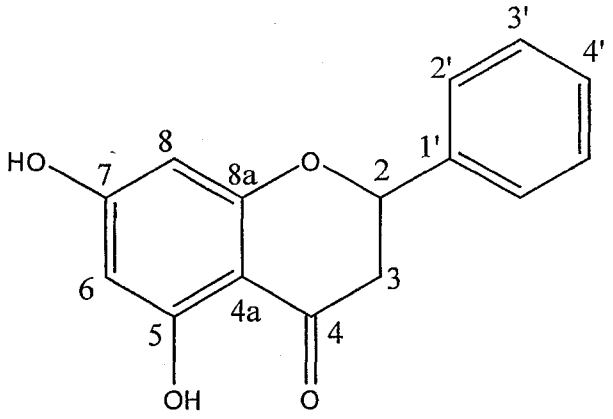


Figure 21 : Pinocembrin (**14**)

Le galangin (**15**) (figure 22) et le pinobanksin (**16**) (figure 23) ont été isolés de la fraction 1F4. L'analyse des spectres RMN du galangin permet son identification car l'absence des signaux ^{1}H des carbones 2 et 3 démontre la présence d'une liaison double entre ces deux carbones. De plus, le déplacement chimique du carbone 3 (137,3 ppm) combiné au ratio *m/z* de 270 démontre qu'un groupement OH est attaché à ce même carbone.

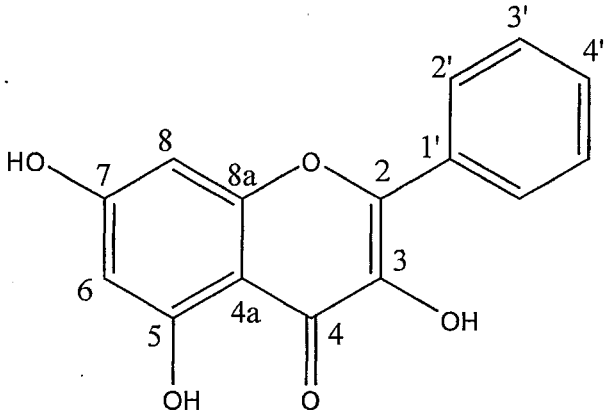


Figure 22 : Galangin (**15**)

Contrairement aux spectres RMN du galangin, les carbones 2 et 3 ont chacun un signal en ^{1}H, ce qui démontre que le composé **16** n'a pas de double liaison entre C2 et C3. Comme les autres signaux sont similaires à ceux de **15**, on peut supposer que cette molécule est en fait le pinobanksin. Le ratio m/z de 272 du spectre de masse semble confirmer cette hypothèse.

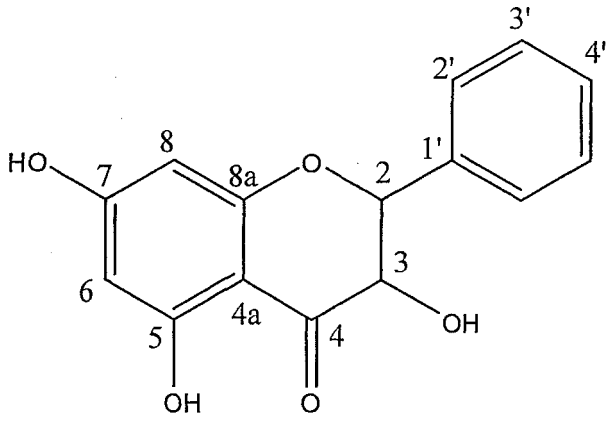


Figure 23 : Pinobanksin (**16**)

Le galangin est répertorié dans les bourgeons de l'espèce (10) et le pinobanksin dans le *Populus deltoides* (37)

Le composé **17** a été isolé de la fraction 3F2-2B (pic 3, figure 9) avec un rendement de 43 %. L'analyse RMN a révélé une structure propre aux flavonoïdes. L'élucidation du spectre a permis d'identifié la structure moléculaire comme étant le galangin avec deux groupements hydroxyles supplémentaires. La position des deux fonctions phénols sur le cycle en retrait a pu être déterminée grâce aux corrélations de 2 carbones aromatiques oxygénés avec les protons aromatiques en C2' C5' et C6'. Le composé a été identifié comme étant la quercétine (figure 24). Étonnamment, la quercétine ne semble pas rapportée dans l'espèce mais on la mentionne dans la propolis et on retrouve un dérivé dans les feuilles du *Populus grandidentata* (38).

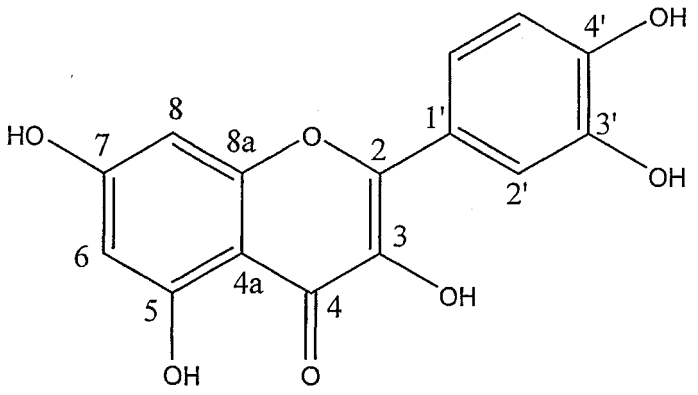


Figure 24 : Quercétine (**17**)

3.3.6 Autres pics

Le pic B observée à 13,36 minutes a été également récupéré. Ainsi, il a été possible d'isoler 4,7 % à partir de la fraction 2F. Les analyses spectroscopiques usuelles n'ont pas permis de révéler l'identité du produit (présence d'un grand nombre de signaux en RMN). Une analyse approfondie par CCM a révélé la présence de plusieurs autres produits. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer la présence de ces impuretés. Tout d'abord, il est possible que ces produits co-éluent dans les conditions d'élution utilisées ou que certains de ces produits ne soient pas détectés à la longueur d'onde de détection. Il est également possible que le composé isolé se dégrade rapidement. En modifiant la méthode HPLC, il devrait être possible de confirmer ou non la présence d'autres composés dans le pic B. S'il est démontré que le composé est pur, son entreposage devra être fait avec plus de précaution.

Le pic J n'a pu être identifié car il n'a pas été isolé en quantité suffisante (2 mg), mais certaine information ont tout de même été obtenue à son sujet. D'après le spectre de masse, le ratio *m/z* est également de 552. De plus, les données partielles du RMN suggèrent fortement que ce composé est le quatrième membre de la famille isolée en 3.3.5. Sur la base uniquement du spectre de masse, on peut également prétendre que le groupement OCH_3 est lié à C4''.

La fraction 3F1 a été séparée en sept nouvelles fractions et la fraction 3F3 en trois nouvelles fractions. Les fractions n'ont pas été envoyées aux tests biologiques. Ces matrices n'ont pas été purifiées davantage car le temps alloué au projet tirait à sa fin. Il ne faut cependant pas écarter la possibilité que ces fractions soient intéressantes d'un point de vue biologique ou chimique.

3.4 Activités biologiques

3.4.1 Activités cytotoxiques

L'extrait de bourgeons a montré une forte cytotoxicité (IC_{50} de 19 à 20 µg/ml) envers les trois lignées cellulaires testées (A549, DLD-1 et WS1). Les fractions 1F (IC_{50} de 26 à 28 µg/ml) et 2F (IC_{50} de 16 à 17 µg/ml) ont montré les cytotoxicités les plus intéressantes. Tel que rapporté au tableau 1, ces fractions ne montrent aucune sélectivité.

3.4.1.1 Composés 7, 8 et 9

Les molécules **7**, **8** et **9** ont une cytotoxicité intéressante sur les cellules cancéreuses testées (tableau 7). Le composé **8** montre la plus forte cytotoxicité, avec des IC_{50} de 5 ± 1 μM sur A549 et de 14,6 ± 0,7 μM sur DLD-1. Le composé **7** a une activité identique sur A549 (IC_{50} de 5 ± 1 μM) mais est moins efficace sur les cellules cancéreuses du colon (IC_{50} de 21 ± 2 μM). Le dernier composé de cette famille (**9**) est beaucoup moins cytotoxique sur les cellules cancéreuses testées avec des IC_{50} de 108 ± 11 μM et de 128 ± 8 μM sur A549 et DLD-1, respectivement. Le groupement fonctionnel lié au carbone 5 semble avoir une influence considérable sur la cytotoxicité. En effet, les IC_{50} sur les cellules testées sont 5 à 20 fois plus sensibles pour les composés **7** et **8** lorsque comparé à **9**.

Tableau 7: Activités biologiques des molécules isolées

Molécules	WS1 (μM)	A549 (μM)	DLD-1 (μM)	*S.aureus* (μM)
1	>200	>200	>200	>160
2	>200	>200	>200	140 ± 8
3	115 ± 9	107 ± 7	>180	50 ± 2
4	49 ± 9	41 ± 2	40 ± 3	2,42 ± 0,08
5	29,7 ± 0,8	34 ± 1	34 ± 2	1,87 ± 0,03
6	23 ± 1	27 ± 4	53 ± 3	3,1 ± 0,3
7	14 ± 2	5 ± 1	21 ± 2	1,26 ± 0,06
8	13 ± 1	5 ± 1	14,6 ± 0,7	1,93 ± 0,07
9	189 ± 14	108 ± 11	128 ± 8	5,9 ± 0,8
10, **12** et **14**	N/D	N/D	N/D	>160
11	168 ± 34	129 ± 36	156 ± 46	38 ± 2
13, **15** à **18**	N/D	N/D	N/D	N/D

3.4.1.2 Balsacones

Les balsacones (**4–6**) ont une cytotoxicité inférieure aux molécules mentionnées dans le paragraphe précédent comme le démontre le tableau 7. Les cytotoxicités des balsacones (**4-6**) sont semblables mais la balsacone C (composé **6**) montre la plus forte cytotoxicité des trois composés. Ces composés semblent n'avoir aucune sélectivité en particulier, sauf la balsacone C, qui a une légère baisse de cytotoxicité sur DLD-1 lorsque comparée aux IC_{50} des deux autres lignées cellulaires testées. Le changement d'un groupement hydroxyle par un hydrogène en position 4 pourrait être à la cause de cette variation. De plus, l'emplacement du groupement méthoxyle sur le cycle aromatique central serait une piste intéressante à investiguer car il y a une disparité importante entre les IC_{50} sur WS1 des balsacones A et B.

3.4.1.3 Autres composés

Tous les autres composés isolés avaient des IC_{50} supérieurs à 100 μM, tel que montré au tableau 7. Ces composés ne démontrent aucune cytotoxicité intéressante.

3.4.2 Activités antibactériennes

Les trois fractions ont démontrés des activités élevées sur *S.aureus* tel que montré au tableau 1. La fraction 2F est la plus intéressante avec une IC_{50} de 0,16 ± 0,04 μg/ml. Cette fraction a également une IC_{50} 100 fois plus sensible sur le *S.aureus* que sur WS1. Les trois fractions n'ont pas eu d'effet significatif sur *E.coli*. Les fractions 1F et 3F ont également une certaine sélectivité envers *S.aureus* par rapport à WS1, mais cette sélectivité est beaucoup moins significative que celle de 2F.

3.4.2.1 Composés 7, 8 et 9

Le composé **7** a obtenu la plus forte valeur IC_{50} (1,26 ± 0,06 μM) du projet sur *S.aureus* comme le démontre le tableau 7. Le composé **8** a une IC_{50} de 1,93 ± 0,07 μM tandis que le composé **9** a une IC_{50} de 5,9 ± 0,8 μM. Le composé **9** a obtenu la meilleure sélectivité antibactérienne (32 fois plus sensible) du projet de recherche. En effet, même si c'est le composé le moins actif des trois, il est presque inerte sur les cellules saines WS1 (IC_{50} de 189 ± 14 μM). Les composés **7** et **8** ont également une forte sélectivité, avec des ratios respectifs de 11 et 7. Le remplacement de l'hydroxyle sur le carbone en position 5 par un groupement méthoxyle semble diminuer l'activité sur *S.aureus*, comme ce fut observé précédemment sur les cellules DLD-1. La seule différence structurale entre **7** et **8** se situe au niveau du groupement fonctionnel en C4'''.

3.4.2.2 Balsacones

Les balsacones isolées ont des activités antibactériennes comparables aux composés **7**, **8** et **9** (tableau 7). La balsacone B (**5**) a obtenue la meilleure IC_{50} du groupe (1,87 ± 0,03 μM) sur *S.aureus*. Les balsacones A (**4**) et C (**6**) ont obtenues respectivement des IC_{50} de 2,42 ± 0,08 μM et de 3,1 ± 0,3 μM sur *S.aureus*. L'IC_{50} de la balsacone A est 20 fois plus sensible sur *S.aureus* que sur WS1. Les balsacones B et C sont moins sélectives que leur homologue, avec des ratios respectifs de 16 et 4. Lorsque l'on compare les structures moléculaires des balsacones à leurs activités antibactériennes, on remarque que les balsacones A et B, qui ont obtenu les plus fortes activités antibactériennes, sont également celles qui avaient le cycle aromatique central porteur d'un groupement méthoxyle.

3.4.2.3 Autres composés

Les IC_{50} de la majorité des autres composés isolés sont disponible dans le tableau 7. Seul deux de ces molécules ont démontrés des activités antibactériennes significatives qui méritent d'être soulignées. Les dihydrochalcones **3** et **11** ont obtenues des IC_{50} respectives de 50 ± 2 μM et de 38 ± 2 μM sur *S.aureus*. Ces IC_{50} sont moins importantes que celles mentionnées précédemment mais elles sont tout de même intéressantes pour deux raisons. Premièrement, ces deux dihydrochalcones ont peu d'effet sur les cellules WS1, le composé **11** en particulier avec une IC_{50} de 168 ± 34 μM. Ensuite, il est difficile d'observer des corrélations entre la structure et l'activité de toutes les dihydrochalcones isolées. Des

Rapport-Gratuit.com

recherches plus approfondies pourraient possiblement permettre de mieux comprendre cette relation entre la structure chimique et l'activité antibactérienne des dihydrochalcones.

3.4.3. Activités antibactériennes sur SARM

Les balsacones, les composés **7**, **8** et **9** ainsi que le composé impur 2FJ (similaire aux composés **7** à **9**) ont été testés sur quatre souches de *S.aureus* (tableau 8). Quatre antibiotiques commerciaux ont été également testés à des fins comparatives. Ces analyses révèlent que les molécules isolées sont, règle générale, 2 à 5 fois moins efficace que la ciprofloxacine, 10 fois moins efficace que la vancomycine et 100 fois moins efficace que la gentamicine. Les composés isolés n'ont pas démontrés de grande fluctuation entre les différentes souches.

Même si les résultats obtenus sont inférieurs aux IC_{50} de certains antibiotiques commerciaux, ces composés conservent tout de même un potentiel thérapeutique intéressant. En effet, ces antibiotiques commerciaux ne sont pas sans risques. Par exemple, la gentamicine peut causer plusieurs troubles psychiatriques comme l'anxiété, la confusion et des hallucinations (39) tandis que la résistance à la vancomycine est un problème de plus en plus commun (40). De plus, ces composés peuvent être considérés deux nouvelles classes d'antibiotiques potentiels qui, développer adéquatement, pourraient être améliorés et même, hypothétiquement, déboucher sur de nouveaux antibiotiques commerciaux.

Tableau 8: Activité antibactérienne des molécules 4 à 9, de 2FJ et de quatre antibiotiques commerciaux sur différentes souches de *S.aureus*.

Molécule	*S.aureus* 14094 (µM)	*S.aureus* 14108 (µM)	*S.aureus* 14118 (µM)	*S.aureus* Wild T. (µM)
4	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,3
5	3,3 ± 0,2	5 ± 133	3,8 ± 0,6	3,6 ± 0,3
6	2,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	3,0 ± 0,6	2,5 ± 0,1
7	1,07 ± 0,04	0,90 ± 0,05	1,96 ± 0,04	1,18 ± 0,07
8	0,71 ± 0,06	0,66 ± 0,06	3,6 ± 0,4	1,11 ± 0,04
9	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,3	8,4 ± 0,9	2,4 ± 0,3
2FJ	5,5 ± 0,2	4,0 ± 0,1	12,5 ± 0,8	6,9 ± 0,2
Ciprofloxacine	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,3	44 ± 1	0,4 ± 0,2
Erythromycine	> 200	> 200	> 200	> 200
Vancomycine	0,27 ± 0,04	0,24 ± 0,04	1,7 ± 0,2	0,57 ± 0,09
Gentamicine	0,016 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,13 ± 0,01	< 0,006

4. CHAPITRE 4 – CONCLUSION

4.1 Conclusions générales

L'objectif du projet de recherche était d'identifier le ou les composés responsables de l'activité antibactérienne des bourgeons du *Populus balsamifera*. Les composés phénoliques ont d'abord été extraits de la matrice de départ par une succession d'extractions à reflux dans un mélange d'éthanol et d'eau. Les composés non-ciblés ont été éliminées par une extraction liquide-liquide avec de l'eau et du chloroforme. Ensuite, une série de fractionnement par chromatographie «flash» a permis de séparer les diverses molécules selon leur polarité. Afin d'atteindre l'objectif fixé, les fractions ayant les activités biologiques les plus élevées ont été ciblées.

La fraction 2F a été la première à être investiguée car elle présentait les activités les plus intéressantes. Cette fraction a été purifiée directement sur HPLC semi-préparatif. Neuf composés (**1-9**) ont été isolés : un acide phénolique (**1**), deux dihydrochalcones (**2, 3**), trois balsacones (**4-6**) et trois dérivés de flavonoïdes (**7-9**). Les trois balsacones, en plus de ne pas être répertoriées dans la littérature, possèdent une forte activité antibiotique sur *S.aureus*. Les dérivés de flavonoïdes, dont un qui n'est pas répertorié dans la littérature, ont des activités antibactériennes comparables aux balsacones. Les composés **7** et **8** ont une activité intéressante sur les cellules cancéreuses du poumon (A549) tandis que le composé **9** démontre peu de toxicité envers les cellules saines (WS1). Ces résultats démontrent clairement que la structure chimique de ces composés influence leur activité

biologique, du moins, sur les différents organismes testés. Comme il s'agit de nouveaux composés et que les résultats sur *S.aureus* sont intéressants, ces six candidats (**4-9**) ont été testés sur quelques souches de SARM. L'activité antibiotique de ces composés est similaire aux résultats obtenus sur la souche de *S.aureus* sensible. Ce résultat suggère que les SARM ne sont pas résistants à ces nouveaux agents antibactériens.

Six molécules (**10-16**) ont été isolées de la fraction 1F. L'acide coumarique (**10**), les trois flavonoïdes (**13-15**) et les deux dihydrochalcones (**11, 12**) isolés étaient tous déjà répertoriés dans le *Populus*. Cette fraction n'a pas été investiguée en totalité et aucun de ces six composés n'a été testé au niveau de la bioactivité. La fraction 3F a été étudiée à la toute fin du projet. Ainsi, il a été possible d'isoler deux composés connus : la quercétine (**17**) et la phlorétine (**18**). Le composé **18** a été répertorié dans le peuplier baumier tandis que **17** se retrouve dans les feuilles du *Populus grandidentata*.

4.2 Perspectives futures

Les balsacones (**4-6**) sont une nouvelle entité chimique tandis que les dérivés de flavonoïdes (**7-9**) ont une structure rarement mentionnée dans la littérature. Le fait d'avoir isolé trois dérivés de chaque famille a permis de faire des comparaisons sommaires entre leur structure chimique générale et leurs activités biologiques. Selon ces simples observations, substitué un méthoxyle par un hydroxyle à une certaine position peut avoir

une influence notable sur les valeurs IC_{50}. Les relations structure-activité ont été très peu investiguées dans le cadre de ce travail. Il serait intéressant d'étudier davantage l'impact de modifications structurales sur l,activité biologique.

Une suite pertinente au projet, considérant les activités biologiques obtenues pour les molécules **4** à **9**, serait l'isolation de ces composés en plus grande quantité (~ 1,0 g) afin de procéder à des tests *in vivo*. Plusieurs voies peuvent être empruntées : le développement d'une méthode de séparation, la synthèse totale, l'hémisynthèse ou la recherche d'un organisme possédant les molécules ciblées en plus grande quantité. Par exemple, la propolis pourrait contenir certains de ces composés.

Pour terminer, une seule fraction a été complètement investiguée dans ce projet. Peut-être que d'autres molécules intéressantes, autant d'un point de vue académique que thérapeutique, attendent encore d'être découvertes dans les bourgeons de *Populus balsamifera*.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

BIBLIOGRAPHIE

1. Marie-Victorin, F. Flore Laurentienne. 3ème édition, Gaëtan Morin Éditeur ltée, Boucherville, **2002**, 1093 pp.

2. Knauth, P. La forêt boréale en Amérique. Techniques de l'ingénieur, Paris, **1975**, 184 pp.

3. Moerman, D.E. Native American ethnobotany. Timber Press Inc., Portland, **2000**. 927 pp.

4. Wani, M.C., Lawrence Taylor, H., Wall, M.E., Coggon, P. et McPhail, A.T., **1971**, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (9), 2325-2327.

5. Nikolakakis, A., Caron, G., Cherestes, A., Sauriol, F., Mamer, O. et Zamir, L.O., **2000**, Taxus canadensis abundant taxane: Conversion to paclitaxel and rearrangements. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8 (6), 1269-1280.

6. Kollef, M.H. et Micek, S.T., **2006**, Methicilin-resistant Staphylococcus aureus: a new community-acquired pathogen?. *Current opinion in infectious diseases*, 19 (2), 161-168.

7. Mohapatra, P.R. **2007**, The Threat of Extensively Drug-Resistant. Tuberculosis, *Clinical infectious diseases*, 44 (6), 888-889.

8. Stahl, J.P. **2005**, Épidémiologie, contrôle et traitements des résistances aux antibiotiques : compte-rendu du 45e congrès ICAAC, Washington, 2005. *Médecine et maladies infectieuses*, 36 (5), 290-296.

9. Christoffersen, R.E., **2006**, Antibiotics- an investment worth making?. *Nature biotechnology*, 24 (12), 1512-1514

10. Isidorov, V.A. et Vinogorova, V.T., **2006**, GC-MS analysis of compounds extracted from buds of Populus balsamifera and Populus nigra. *Z. Naturforschung. C, Journal of biosciences,* 58 (5-6), 355-360.

11. Kurkin, V.A., Zapesochnaya, G.G. et Braslavaskii, V.B., **1990**, Flavonoids of the buds of Populus balsamifera. *Chemistry of Natural Compounds*, 26 (2), 272-273.

12. Assiniwi, B., La médecine des indiens d'amérique. Guérin, Montréal, **1988**, 448 pp.

13. Van Wyk, B-E. et Wink, M., Medicinal Plants of the world: chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. 1ère édition, Timber Press Inc., Portland, **2005**

14. Dickmann, D., Conseil national de recherches du Canada, Conseil du peuplier du Canada et Poplar Concil of the United States, Poplar culture in North America. NRC Research Press, Ottawa, **2001**, 397 pp.

15. Van Hoff, L., Totté, J., Corthout, L. A., Pieters, F., Mertens, D.A., Vanden Berghe, A. J., Vlietinck, R. et Dommisse, E. Esmans., **1989**, Plant Antiviral Agents, VI. Isolation of Antiviral Phenolic Glucosides from Populus Cultivar Beaupre by Droplet Counter-Current Chromatography. *Journal of Natural Product*, 52 (4), 875-878.

16. English, S., Greenaway, W. et Whatley, F.R., **1991**, Bud Exudate Composition of Populus tremuloides, *Canadian Journal of Botany*, 69, 2291-2295.

17. Kurkin, V. A., Zapesochnaya, G. G. et al., **1994**, *Zhurnal Fiticheskoi Khimii,* 68, 1816-1818. (article écrit en russe et traduit par Vakhtang Mshvildadze)

18. Isaeva, E.V. et Podol'skaya, T.M., **1997** *Lesnoi Zhurnal*, 4, 58-62. (article écrit en russe et traduit par Vakhtang Mshvildadze)

19. Greenaway, W., May, J. et Whatley, F. R., **1989**, Flavonoid aglycones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of Populus balsamifera., *Journal of chromatography,* 472, 393-400.

20. Ghisalberti, E. L., **1979**, Propolis: a review., *Bee World*, 60, 59-84.

21. Dewick, P.M., **1995**, The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 12, 579-607.

22. Arts, I.C. et Hollman, P.C., **2005**, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1), 317S-325S.

23. Yamamoto, Y. et Gaynor, R.B., **2001**, Therapeutic potential of inhibition of the NF KappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of clinical investigation*, 107, 135-142.

24. Wach, A., Pyrzynska, K. et Biesaga, M., **2007**, Quercetin content in some food and herbal samples, *Food chemistry,* 100 (2), 699-704.

25. Delgado, G., M., D. S. Olivares, M. I. Cavez, T. Ramirez-Asapn, E. Linares, et R. Bye y F. Espinosa-Garcia., **2001**, Anti-inflammatory constituents from Heterotheca inuloides. *Journal of Natural Product*, 64 (7), 861-864.

26. Peterson, J.J., Beecher G.R., Bhagwat S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B. et Holden J.M., 2006, Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compliation and review of the data from the analytical literature. *Journal of food composition and analysis*, 19, S74-S80.

27. Parmar, V.S., Sharma, S.K., Vardhan, A., Rakesh, K. S., Jørgen, M. et Per M., B., **1993**, New framentation pathways in the electron impact mass spectrometry of derivatized pyrano-1,3-diphenylprop-2-enones. *Organic Mass Spectrometry*, 28 (1), 23-26.

28. Gerhauser, C., Alt. A, Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauft, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H. et Becker, H., 2002, Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1 (11), 959-969.

29. Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. et Whatley, F.R., **1991**, Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z. Naturforsch,* 46c, 111-121.

30. Marcucci, M.C., **1995**, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie,* 26, 83-99.

31. Hidri, N. et Lalande, **2001**, Antibiorésistance : Un phénomène naturel. *Le généraliste.* [En ligne] 2086. http://www.legeneraliste.fr/.

32. O'Brien, J., Wilson I, Orton, T. et Pognan, F., **2000**, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem*, 267, 5421-5426.

33. Banfi, E., Scialino, G. et Monti-Bragadin, C.J., **2003**, Development of a microdilution method to evaluate Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.,* 52 (5), 796-800

34. Bauer, A.W., Kirby, M.D.K., Sherris, J.C. et Turck, M., **1966**, Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. *American Journal of Clinical Pathology,* 45, 493-496.

35. English, S., Greenaway, W. et Whatley, F.R., **1990**, Analysis of phenolics of Populus trichocarpa bud exudate by GC-MS. *Phytochemistry,*30 (2), 531-533.

36. Conserva, L.M., Massayoshi, Y., Otto, R., Gottlieb, J.C., Martinez. V. et Gottlieb H.C., **1990**, Iryantherins, lignoflavonoids of novel structural types from the myristicaceae, *Phytochemistry*, 29 (12) 3911-3918.

37. English, S., Greenaway, W. et Whatley, F.R., **1992**, Analysis of phenolics in the bud exudates of Populus deltoides, P. fremontii, P. sargentiiand and P. Wislizeniii by GC-MS. *Phytochemistry*, 31 (4), 1255-1260.

38. Pearl, I.A. et Darling, S.F., **1963**, Studies on the Leaves of the Familu salicaceae. II. Quercetin-3-glucosiduronic Acid from Populus grandidentata Leaves., *J. Org. Chem.,* 28 (5), 1442.

39. A.J. Giannini et H.R. Black, Psychiatric, Psychogenic and Somatopsychic Disorders Handbook.. Medical Examination Publishing Co. Garden City, NY, **1978**, 136-137

40. Smith, T.L., Pearson, M.L., Wilcox, K.R., Cruz, C., Lancaster, M.V., Robinson-Dunn, B., Tenover, F.C., Zervos, M.J., et al., **1999**, Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus Working Group. *The New England journal of medicine* 340 (7), 493–501.

ANNEXES

Tableau 9: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de l'acide coumarique

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	125,8	-
2,6	129,7	7,45 [d, 8,5]
3,5	115,4	6,83 [d, 8,5]
4	159,7	-
1'	114,3	6,29 [d, 15,8]
2'	145,2	7,62 [d, 15,8]
COOH	170,6	-

Tableau 10: Assignation des signaux NMR ^{1}H et ^{13}C du 2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	133,6	-
2,6	128,8	7,13 [d, 8,6]
3,5	113,2	6,81 [d, 8,6]
4	157,8	-
β	29,8	2,86 [t]
α	45,6	3,29 [m]
CO	204,7	-
1'	103,8	-
2', 6'	164,3	-
3', 5'	94,2	5,83 [s]
4'	164,6	-
OCH_3	54,1	3,75 [s]

Tableau 11: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	141,7	-
2,6	127,9	7,25 [m]
3,5	127,9	7,25 [m]
4	125,3	7,15 [m]
β	30,7	2,95 [t]
α	45,4	3,32 [m]
CO	204,5	-
1'	103,8	-
2', 6'	164,6	-
3', 5'	94,2	5,83 [s]
4'	164,3	-

Tableau 12: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de l'acide cinnamique

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	130,1	-
2,6	128,7	7,56
3,5	127,9	7,38
4	134,6	7,38
1'	118,2	6,47 [d, 16,0]
2'	145,0	7,65 [d, 16,0]
COOH	169,1	-

Tableau 13: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la balsacone B

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	135,2	-
2,6	130,4	7,13 [d, 8,5]
3,5	114,8	6,80 [d, 8,5]
4	159,4	-
β	31,6	2,88 [t, 8,3]
α	47,4	3,29 [m]
CO	207,8	-
1'	105,3	-
2'	165,1	-
3'	106,7	-
4'	163,9	-
5'	95,0	5,94 [br s]
6'	161,8	-
1"	131,3	-
2", 6"	128,1	7,12 [d, 8,5]
3", 5"	116,2	6,66 [d, 8,5]
4"	157,4	-
7"	130,2	6,25 [br d, 15,7]
8"	126,8	6,10 [dt, 15,7; 6,3]
9"	26,5	3,36 [m]
OCH_3	55,7	3,73 [s]

Tableau 14: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la balsacone C

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	143,3	-
2,6	129,5	7,23 [m]
3,5	129,4	7,23 [m]
4	126,9	7,14 [m]
β	32,4	2,95 [t, 8,3]
α	47,1	3,33 [m]
CO	206,2	-
1'	105,3	-
2'	165,2	-
3'	106,7	-
4'	163,9	-
5'	95,0	5,94 [br s]
6'	161,8	-
1"	131,4	-
2", 6"	128,1	7,12 [m]
3", 5"	116,2	6,66 [d, 8,5]
4"	157,4	-
7"	130,2	6,25 [br d, 15,7]
8"	126,8	6,11 [dt, 15,7; 6,3]
9"	26,5	3,36 [m]

Rapport-Gratuit.com

Tableau 15: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **9**

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
2	83,4	4,61 [d]
3	36,9	2,11
4	25,1	2,28; 2,82
4a	162,5	-
5	94,6	5,88
6	164,5	-
7	104,0	-
8	158,1	-
8a	101,3	-
1'	129,8	-
2',6'	128,6	7,25 [d]
3',5'	115,1	6,78
4'	157,5	-
1"	129,1	-
2",6"	126,7	7,09 [d]
3",5"	115,0	6,66
4"	156,2	-
7"	131,5	6,19 [d, 15,7]
8"	123,2	5,88
9"	35,2	1,88, 2,11
1'''	132,8	-
2''',6'''	128,4	6,55 [d]
3''',5'''	113,0	6,6
4'''	157,5	-
7'''	29,4	2,65 [t]
8'''	45,1	2,95; 3,08
9'''	204,6	
OCH_3	54,1	3,70 [s]

Tableau 16: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',6'-dihydroxy-4,4'-diméthoxydihydrochalcone

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	159,3	-
2,6	114,7	6,76 [d, 6,6]
3,5	130,3	7,15 [d, 8,6]
4	135,0	-
β	31,1	2,86 [t]
α	47,2	3,29 [m]
CO	206,5	-
1'	106,3	-
2', 6'	165,5	-
3', 5'	94,3	5,91 [s]
4'	167,4	-
7'	55,8 ou 55,6	3,75 [s]
1"	55,8 ou 55,6	3,73 [s]

Tableau 17: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	141,6	-
2,6	127,8	7,22
3,5	127,9	7,22
4	125,4	7,11
β	30,5	2,89 [t]
α	45,5	3,28
CO	204,8	-
1'	104,4	-
2', 6'	164,1	-
3', 5'	92,8	5,87 [s]
4'	166,0	-
OCH_3	54,3	3,71 [s]

Tableau 18: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du pinocembrin

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
2	80,3	5,36 [dd, 2.9 et 12.9]
3	44,1	3,32 et 3,01 [m,m]
4	197,2	-
4a	103,2	-
5	168,3	-
6	97,2	5,89 [s]
7	165,4	-
8	96,2	5,89 [s]
8a	164,6	-
1'	140,3	-
2', 6'	127,3	7,36 [m]
3', 5'	129,7	7,36 [m]
4'	129,6	7,36 [m]

Tableau 19: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du 2',4',6',4-tetrahydoxydihyrochalcone

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
1	132,4	-
2,6	128,8	7,04 [d]
3,5	114,6	6.68 [d]
4	154,9	7,11
β	30,0	2,84 [t]
α	45,8	3,26 [t]
CO	204,8	-
1'	103,8	-
2', 6'	164,6	-
3', 5'	94,2	5,81 [s]
4'	164,3	-

Tableau 20: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C du pinobanksin

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
2	85,0	5,06 [d, 11,5]
3	73,7	4,53 [d, 11,5]
4	198,2	-
4a	101,8	-
5	165,3	-
6	97,4	5,96 [s]
7	168,7	-
8	963	5,91 [s]
8a	164,3	-
1'	138,5	-
2', 6'	128,9	7,54 [m]
3', 5'	129,4	7,38 [m]
4'	129,9	7,38 [m]

Tableau 21: Assignation des signaux RMN ^{1}H et ^{13}C de la quercetine

Position	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) [mult. J en Hz]
2	147,2	5,06 [d, 11,5]
3	136,5	4,53 [d, 11,5]
4	175,8	-
4a	103,0	-
5	161,8	-
6	97,7	6,18 [s]
7	166,4	-
8	92,8	6,38 [s]
8a	156,7	-
1'	122,6	-
2'	114,4	7,74 [s]
3'	144,7	-
4'	146,4	-
5'	114,7	6,88 [d]
6'	120,1	7,64 [d]

Tableau 22: Activité antibactérienne des molécules 4 à 9, de 2FJ et de quatre antibiotiques commerciaux sur différentes souches de *S.epidermiss*.

Molécule	*S.epidermis* 14069 (µM)	*S.epidermis* 14085 (µM)	*S.epidermis* 14093 (µM)	*S.epidermis* 14094 (µM)
4	5,3 ± 0,2	4,5 ± 0,3	8,6 ± 0,6	3,5 ± 0,3
5	5,0 ± 0,3	4,4 ± 0,3	7,0 ± 0,3	3,5 ± 0,3
6	4,5 ± 0,3	3,6 ± 0,4	6,3 ± 0,6	2,4 ± 0,2
7	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,1	0,77 ± 0,04
8	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2	4,3 ± 0,1	0,60 ± 0,02
9	8,9 ± 0,1	5,5 ± 0,2	10,8 ± 0,4	0,71 ± 0,06
2FJ	26 ± 1	11,6 ± 0,3	25 ± 3	3,9 ± 0,2
Ciprofloxacine	31 ± 2	26,3 ± 0,8	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,1
Erythromycine	> 200	> 200	> 200	> 200
Vancomycine	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,28 ± 0,04
Gentamicine	< 0,006	< 0,006	< 0,006	< 0,006

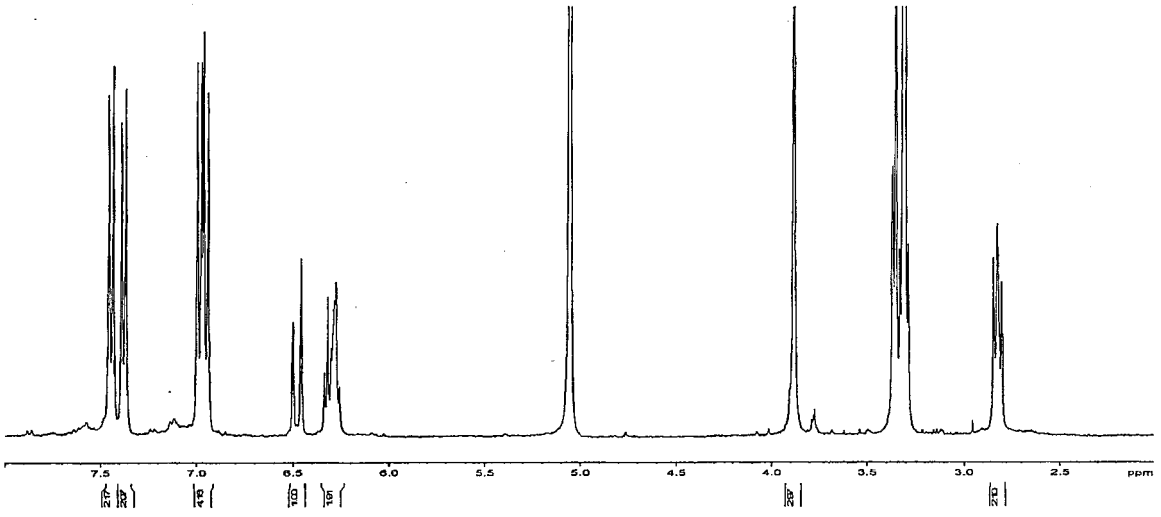


Figure 25 : Spectre RMN ^{1}H du composé **4**

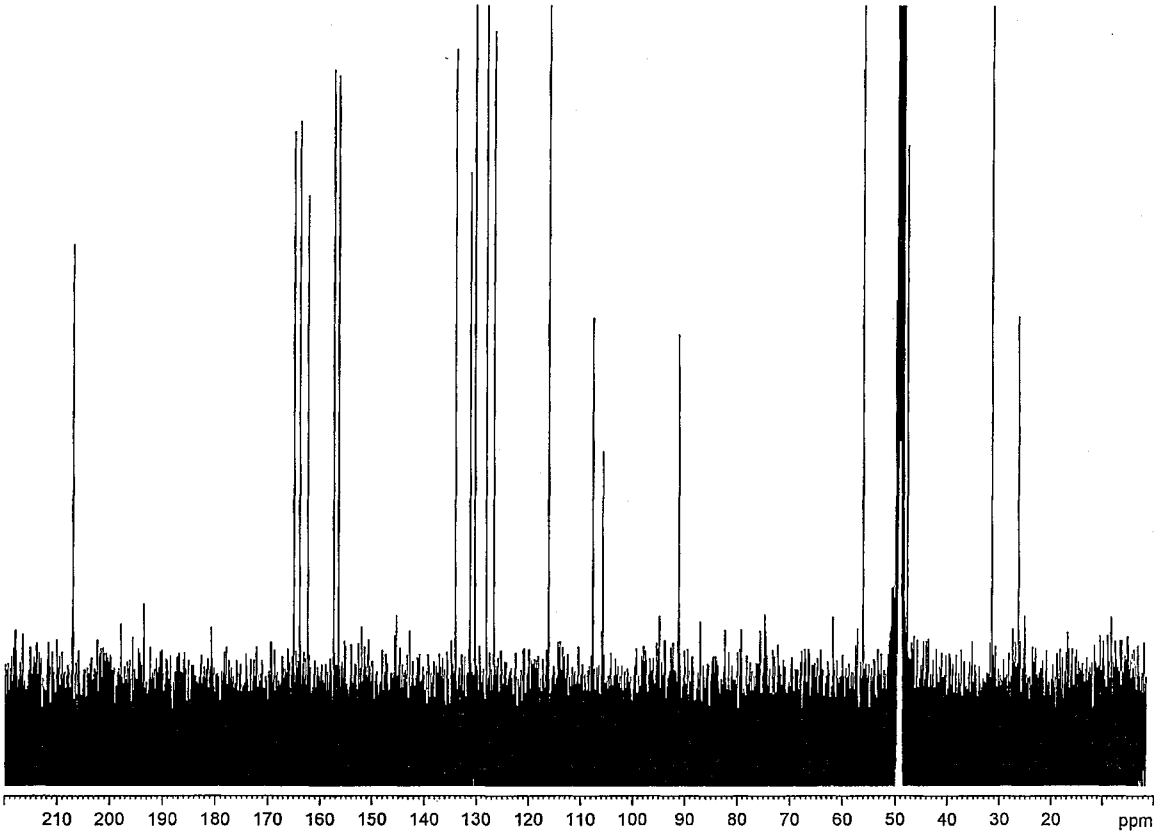


Figure 26 : Spectre RMN ^{13}C du composé **4**

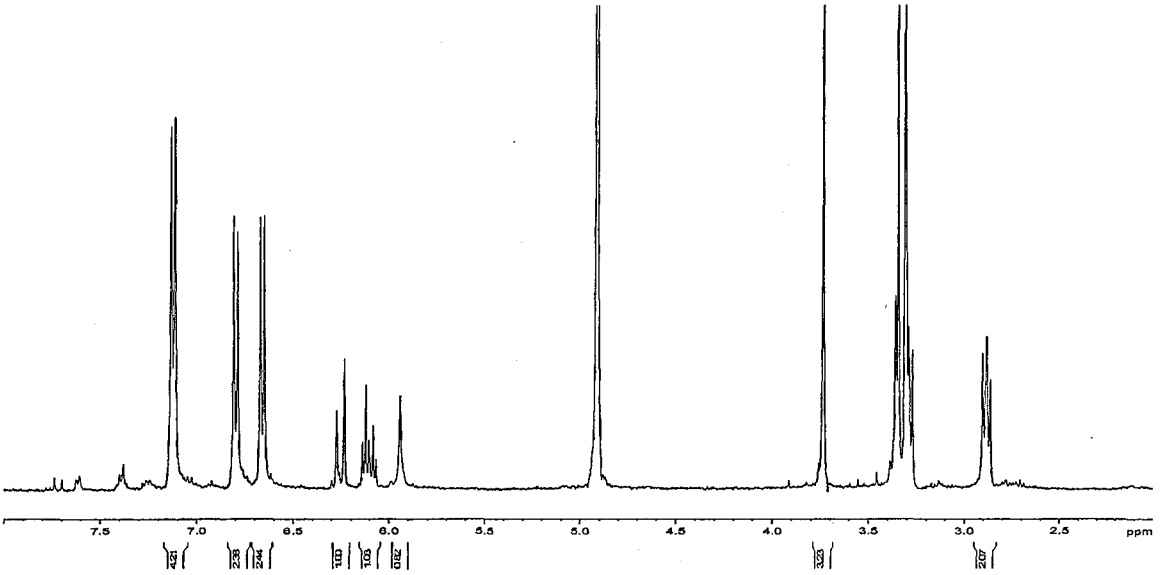


Figure 27 : Spectre RMN ^{1}H du composé **5**

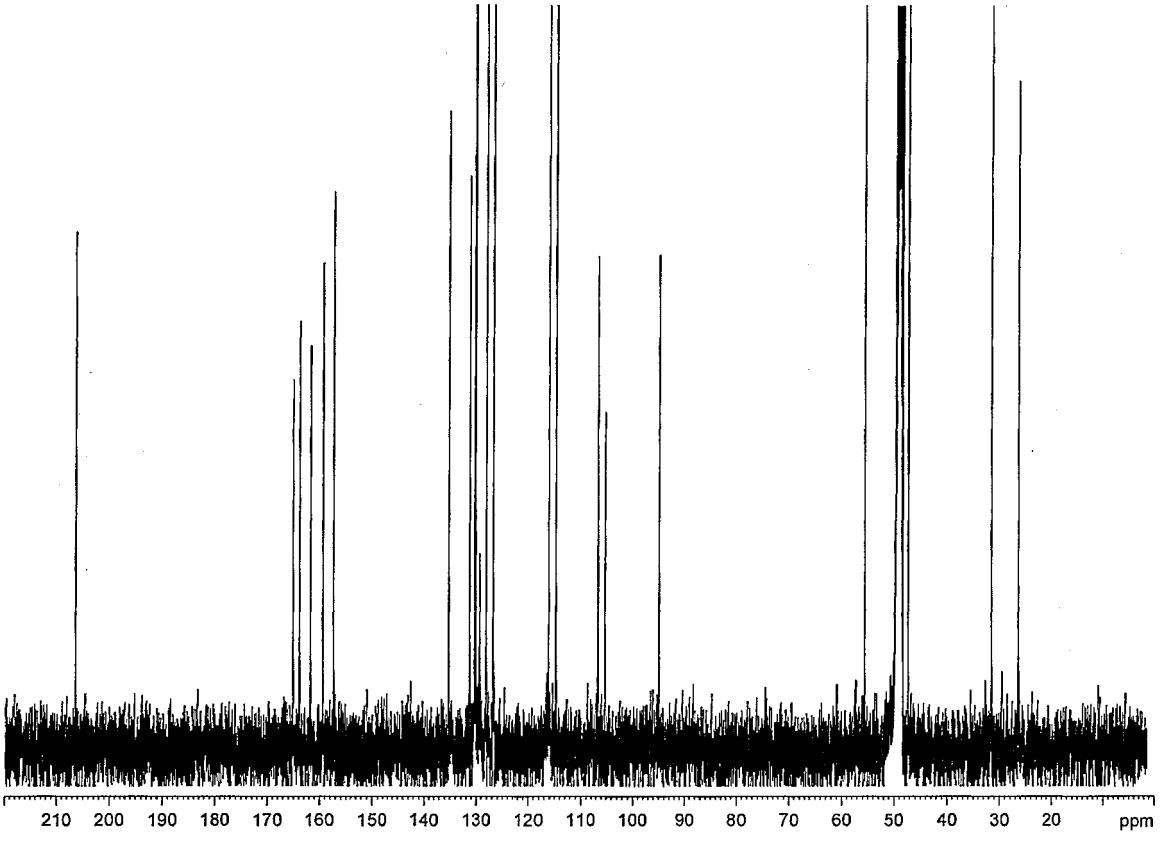


Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C du composé **5**

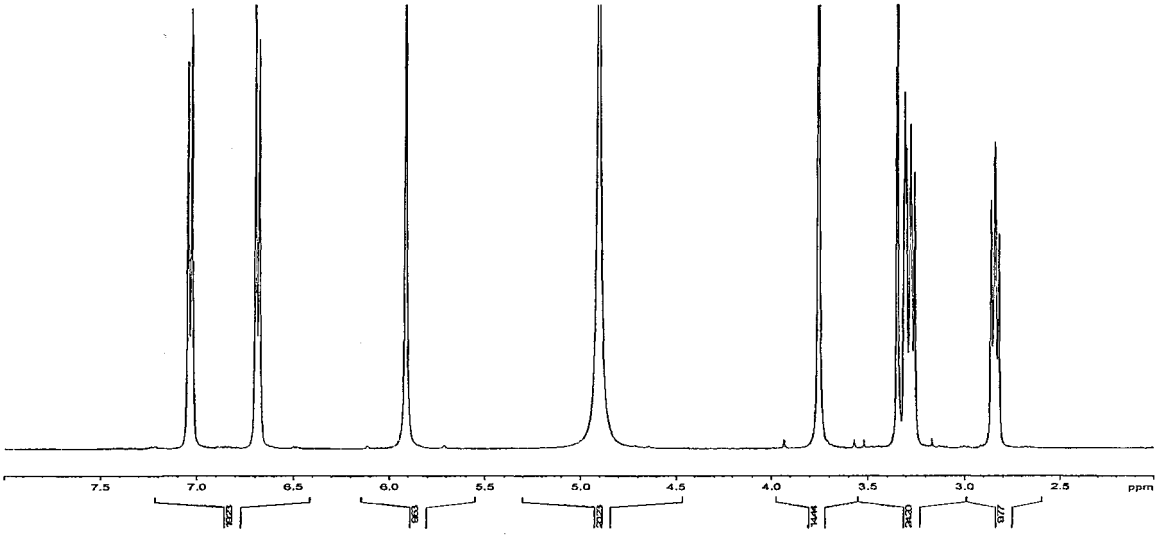


Figure 29 : Spectre RMN ^{1}H du composé **6**

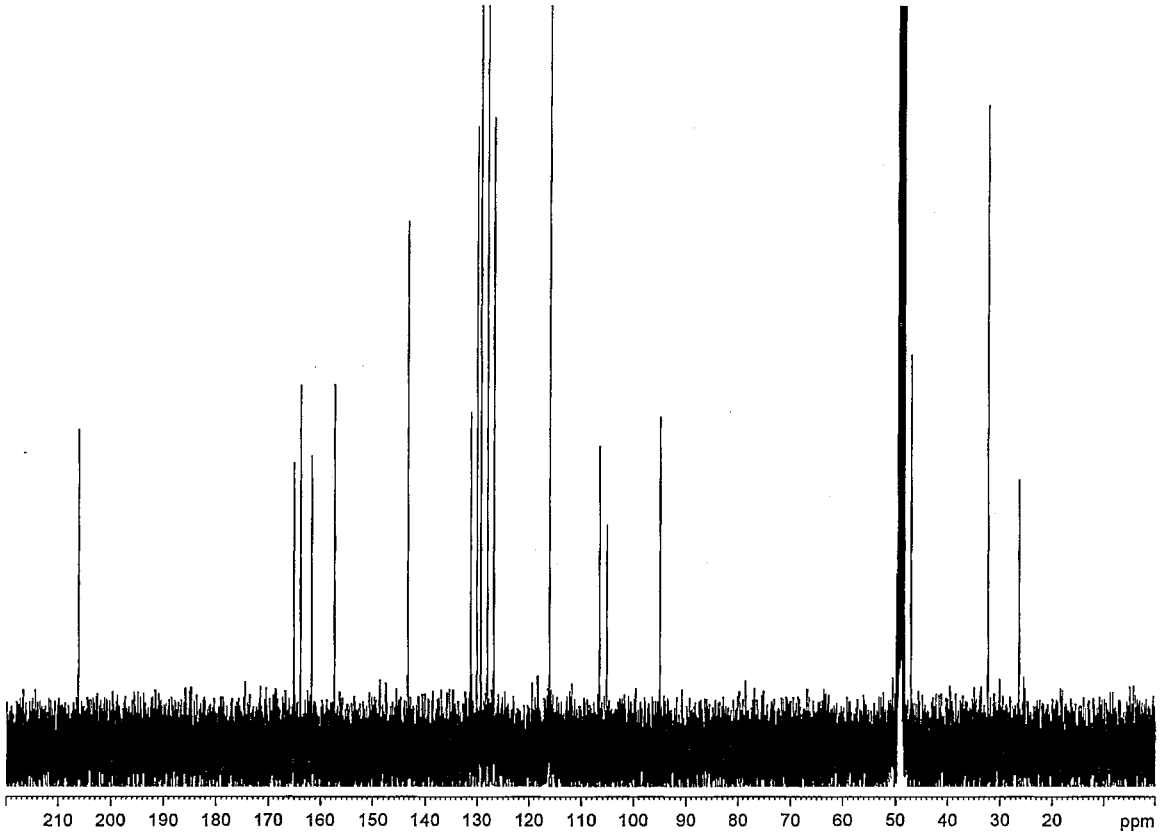


Figure 30 : Spectre RMN ^{13}C du composé **6**

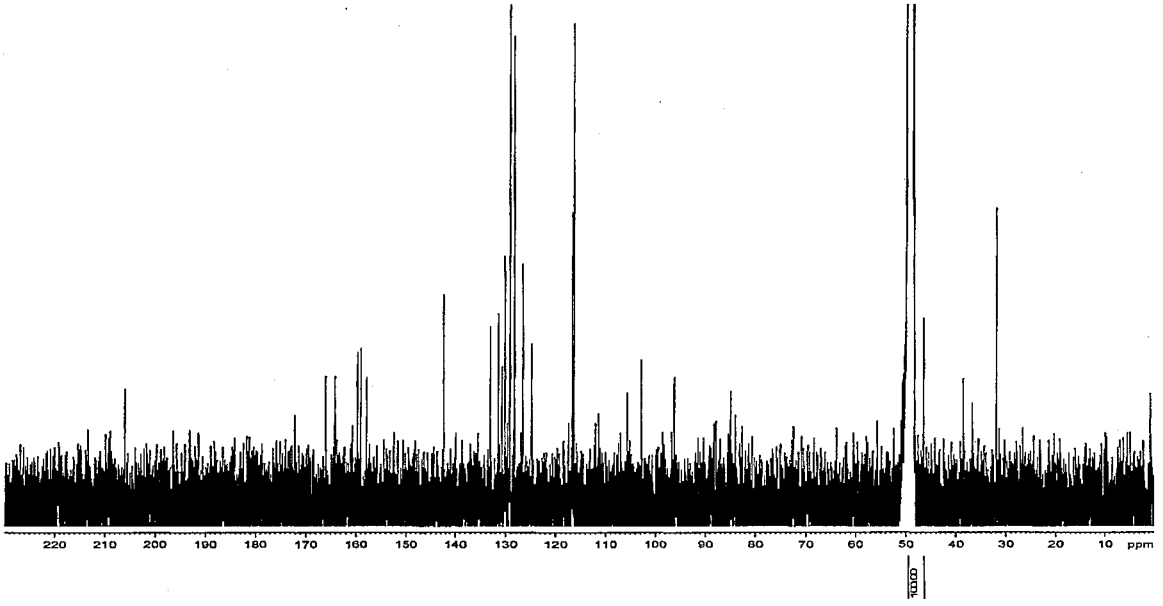


Figure 31 : Spectre RMN ^{13}C du composé **7**

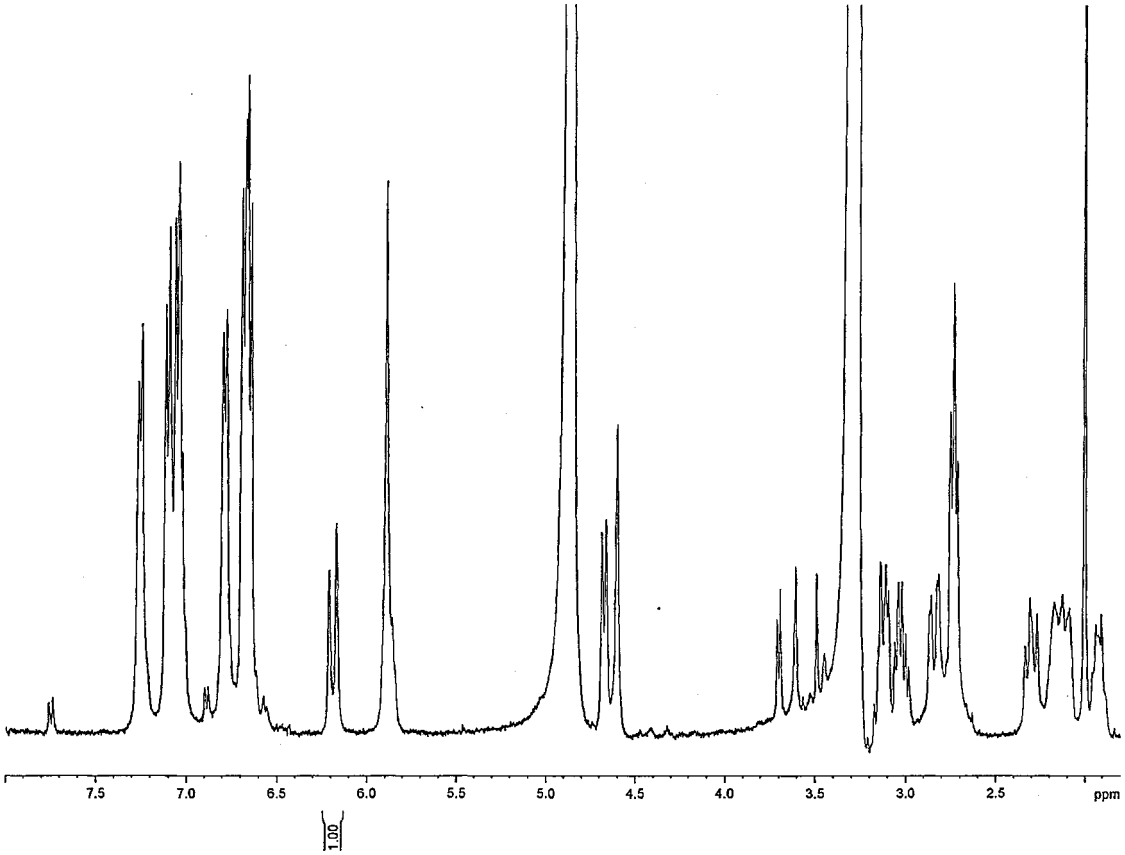


Figure 32 : Spectre RMN ^{1}H du composé **7**

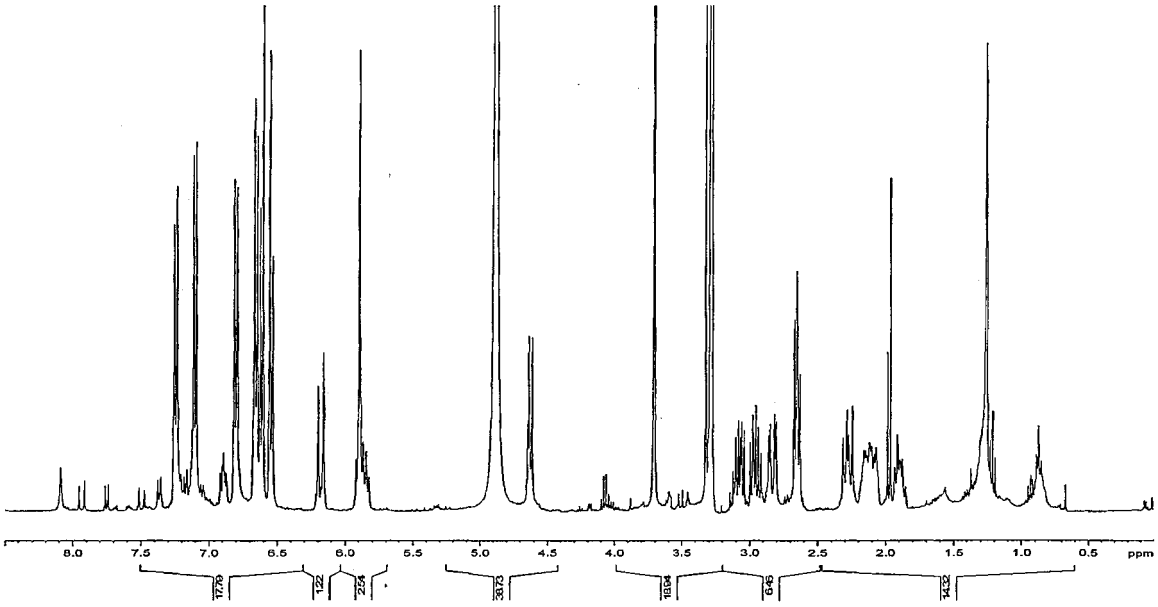


Figure 33 : Spectre RMN ^{1}H du composé **8**

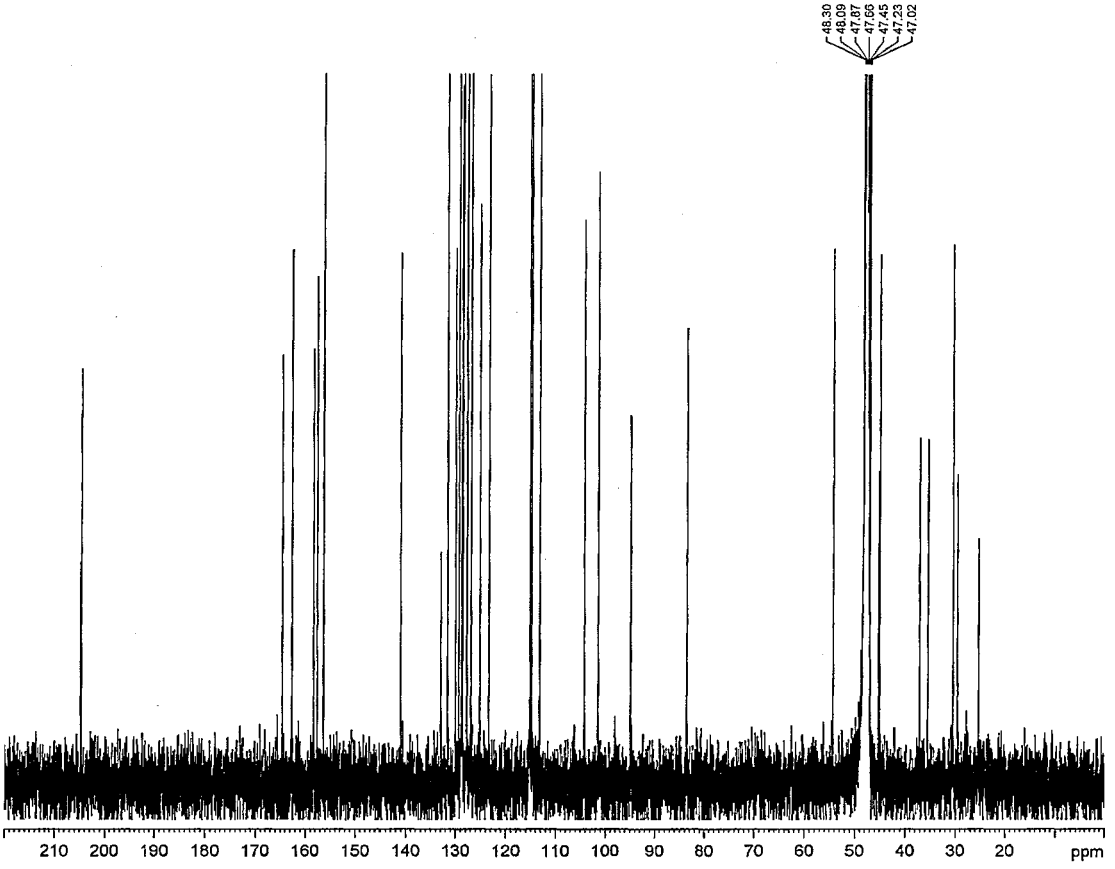


Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C du composé **8**

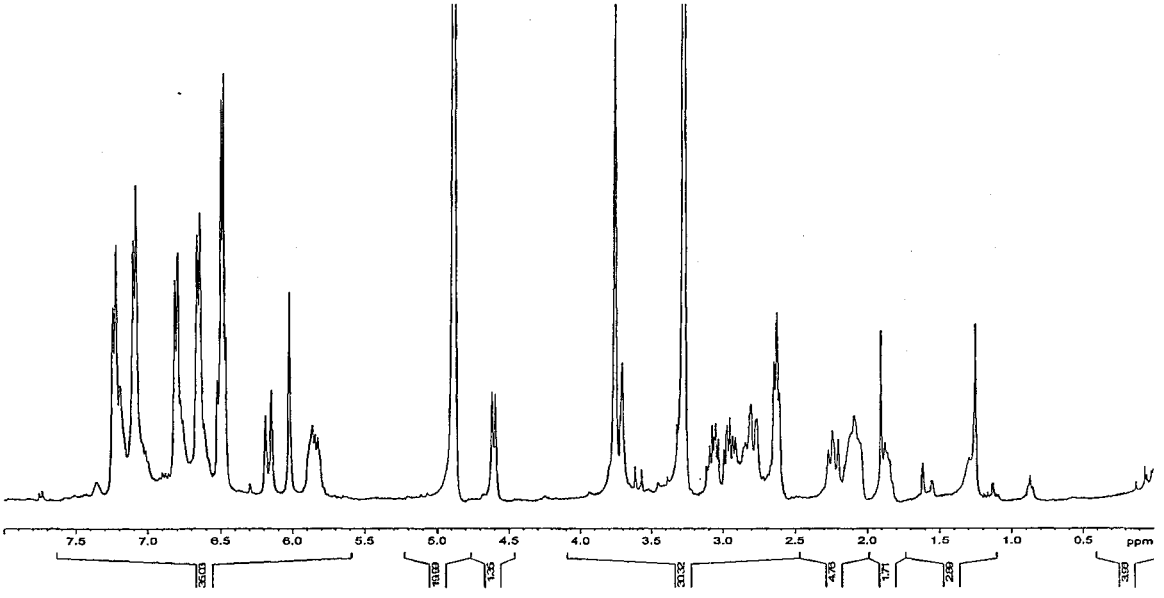


Figure 35 : Spectre RMN ^{1}H du composé **9**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

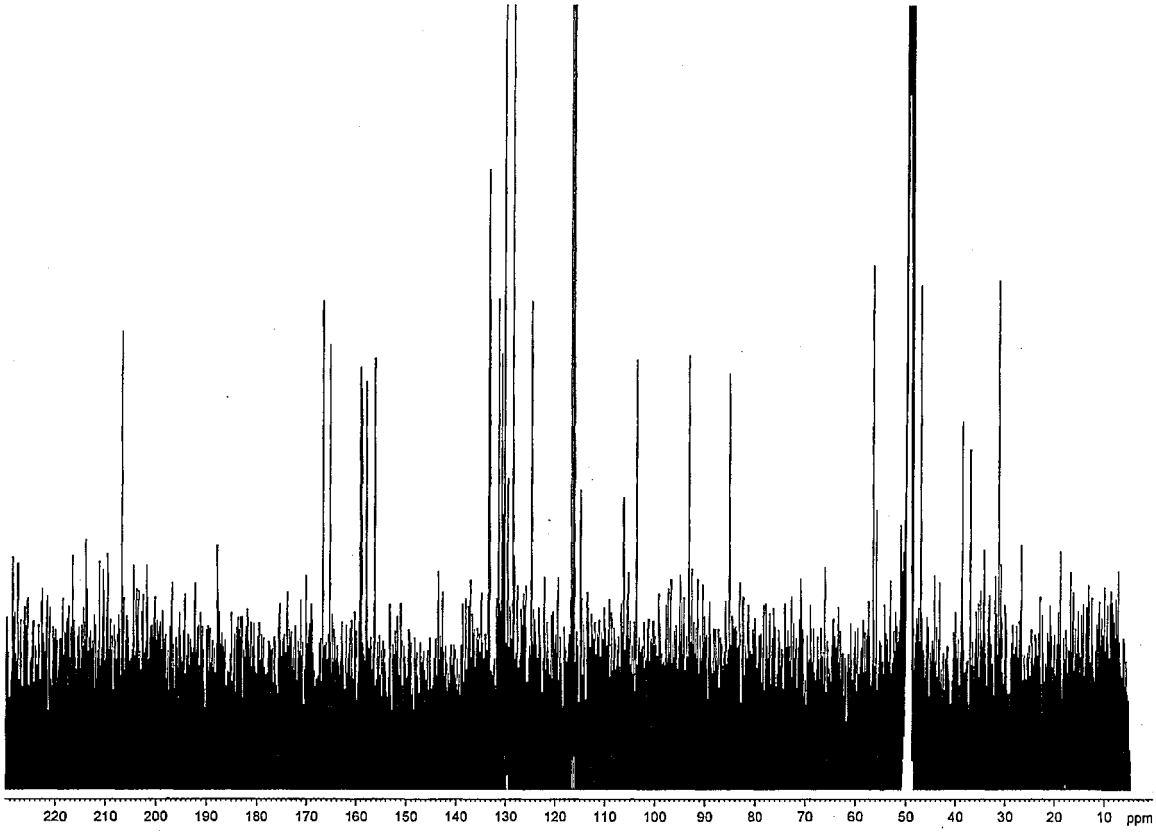


Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C du composé **9**

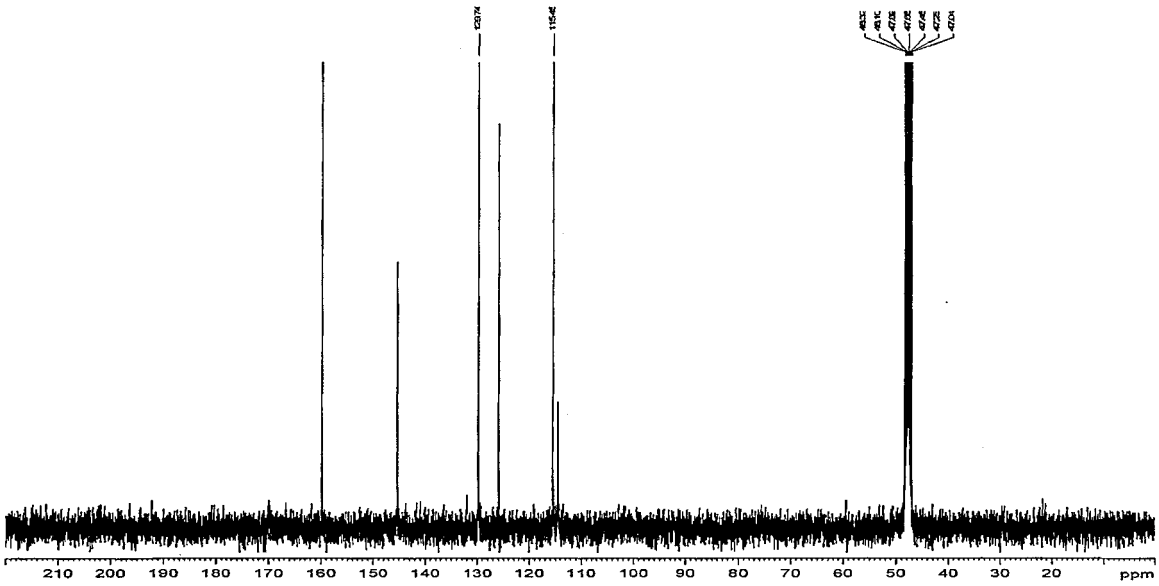


Figure 37 : Spectre RMN ^{13}C du composé **1**

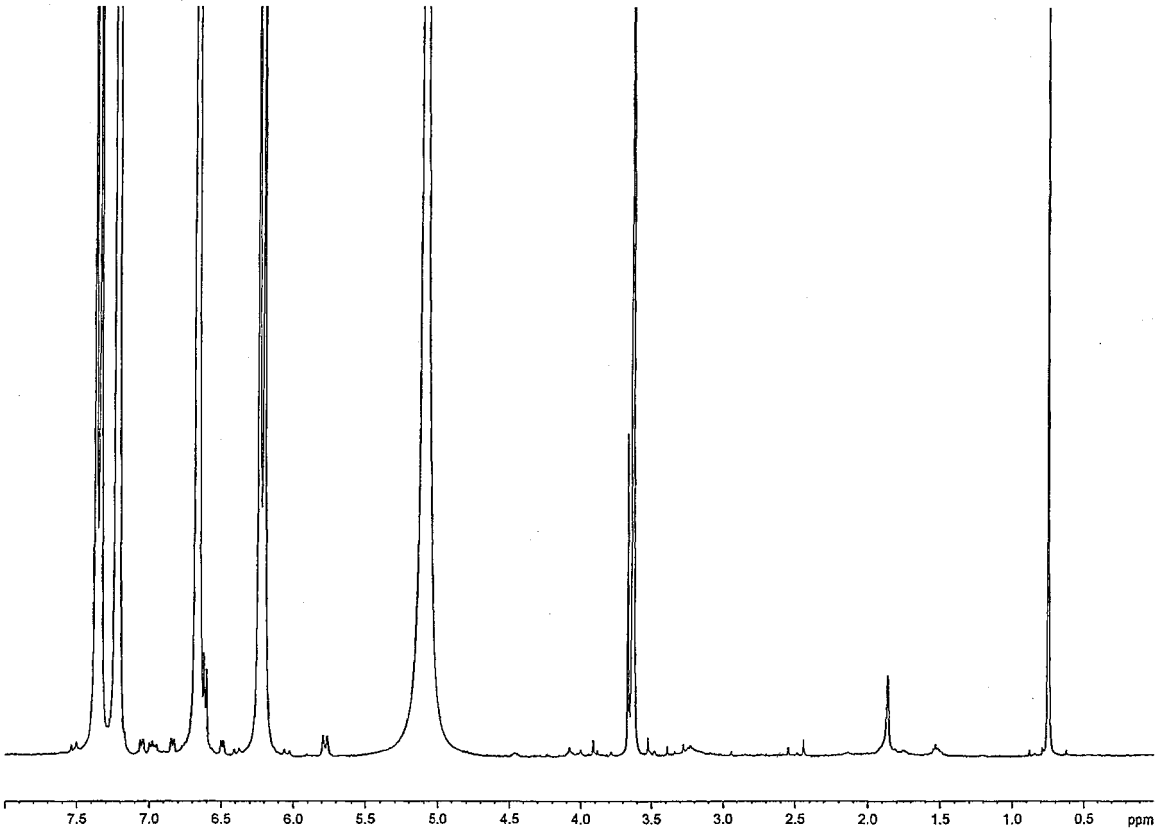


Figure 38 : Spectre RMN ^{1}H du composé **1**

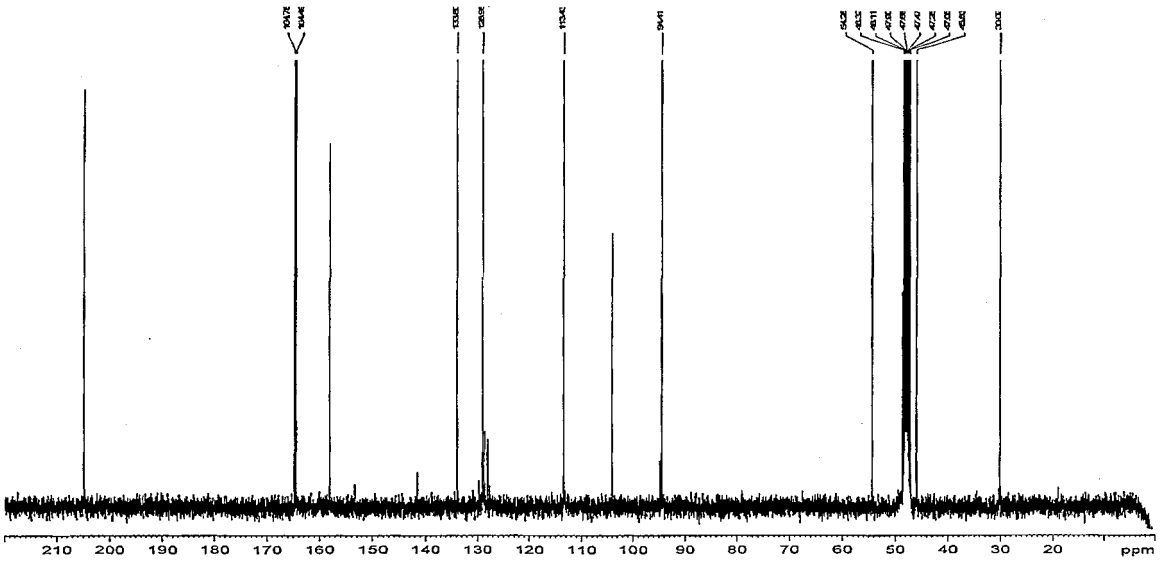


Figure 39 : Spectre RMN ^{13}C du composé **2**

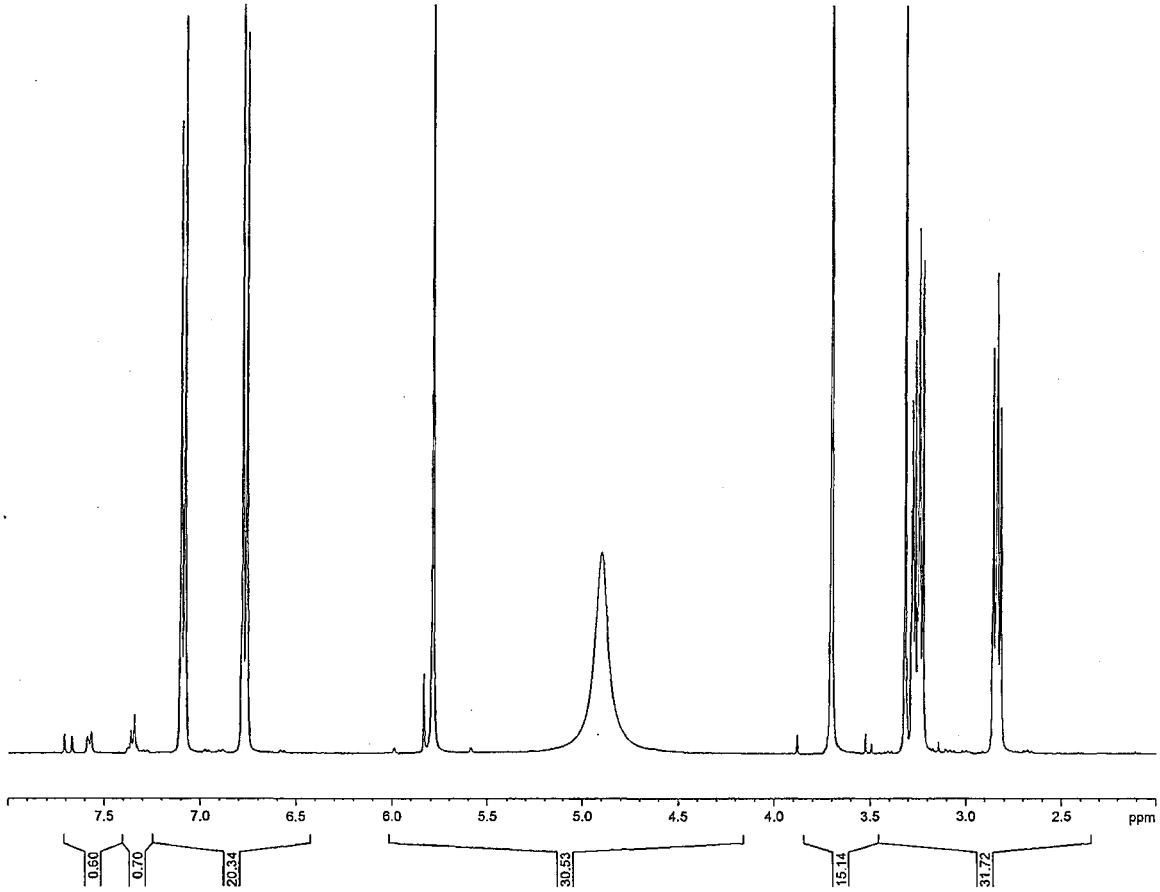


Figure 40 : Spectre RMN ^{1}H du composé **2**

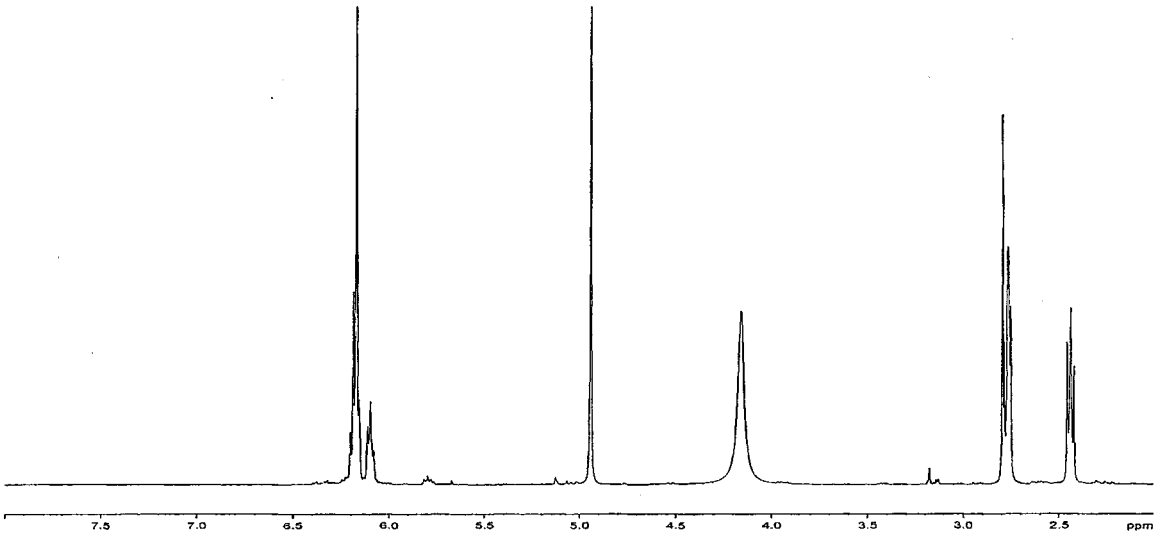


Figure 41 : Spectre RMN ^{1}H du composé **3**

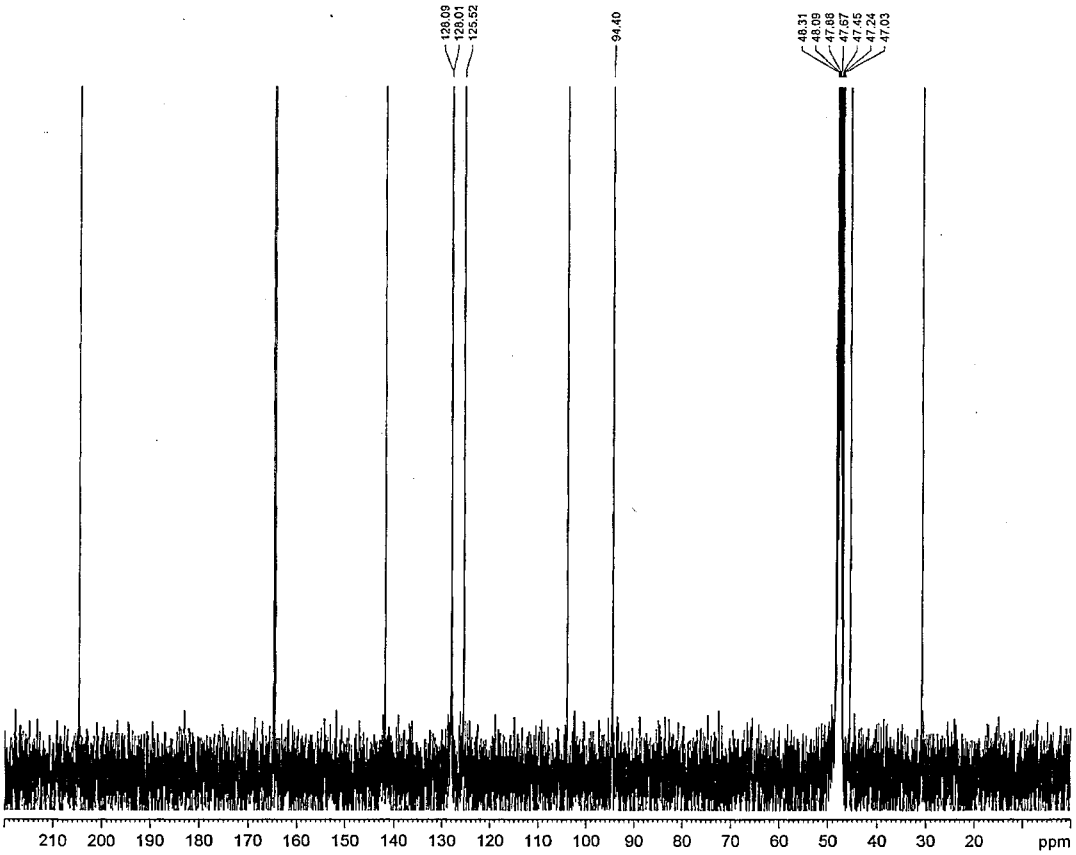


Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C du composé **3**

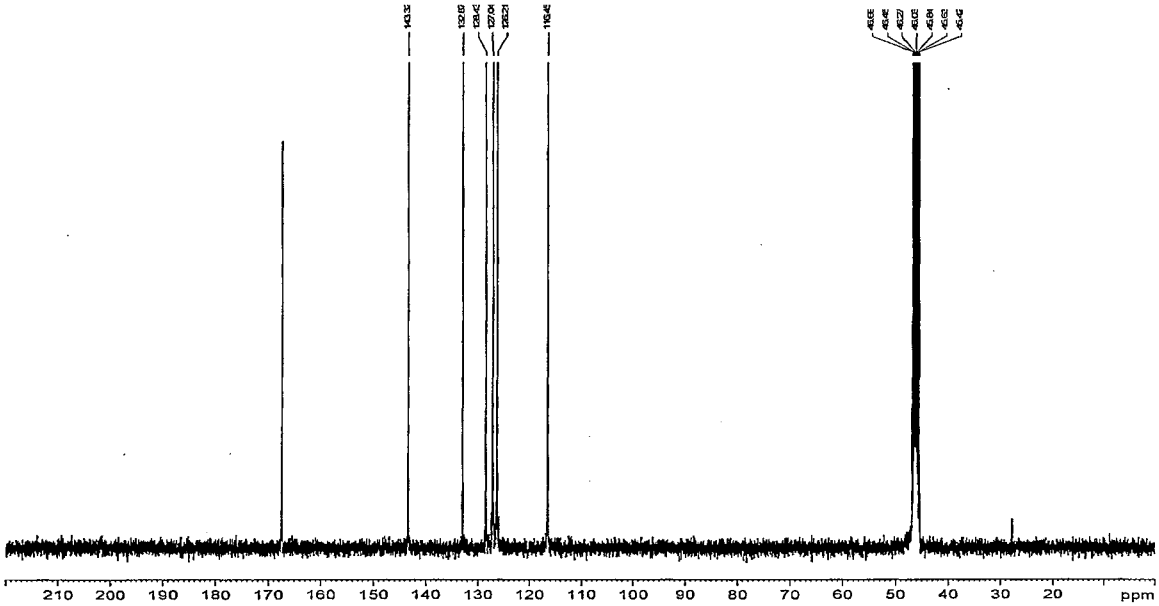


Figure 43 : Spectre RMN ^{13}C du composé **10**

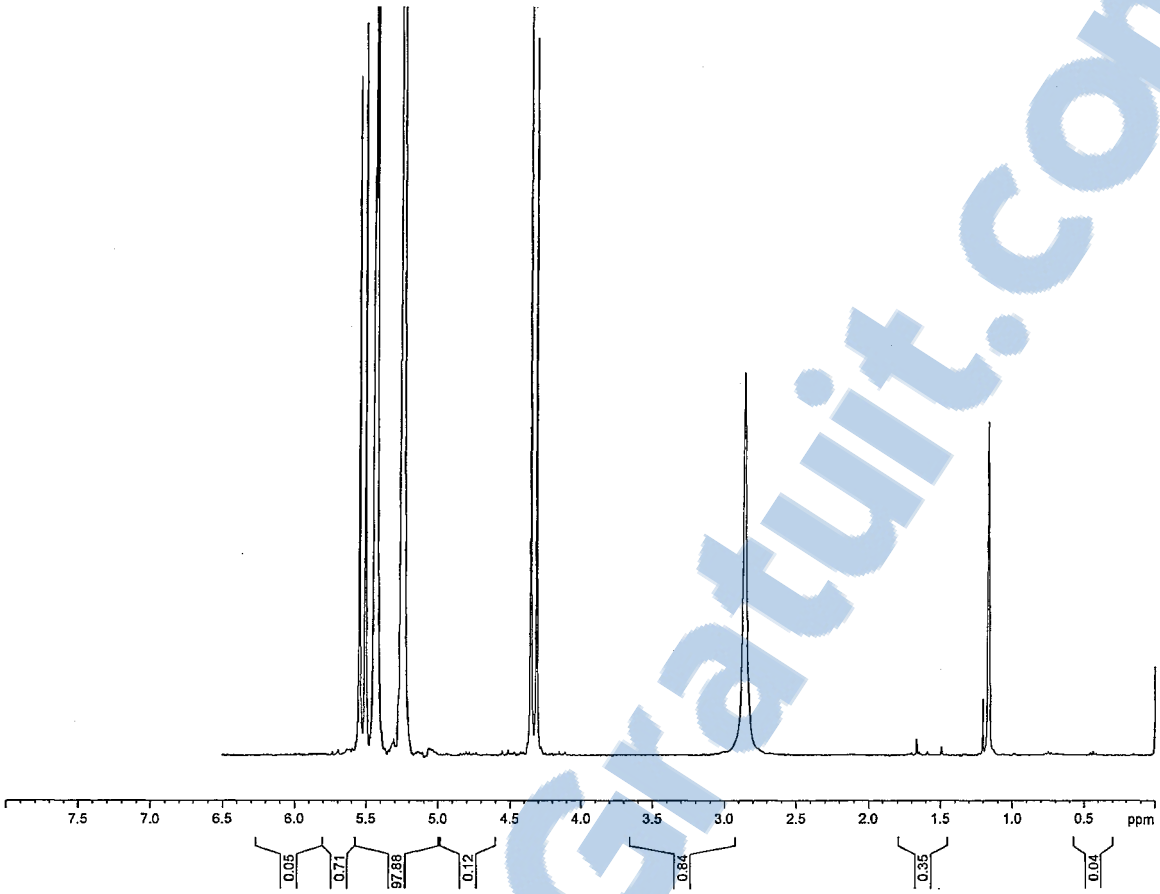


Figure 44 : Spectre RMN ^{1}H du composé **10**

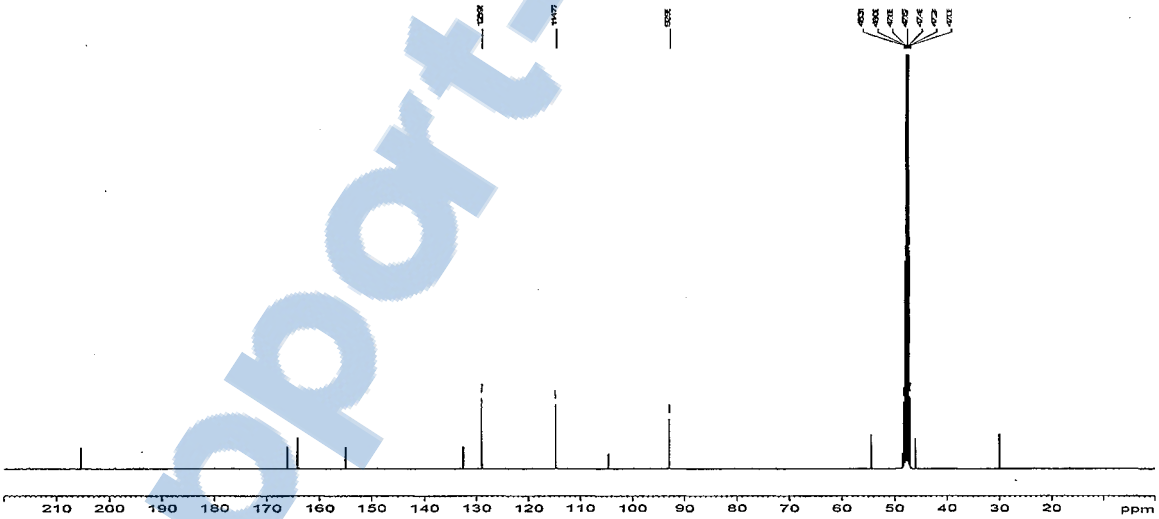


Figure 45 : Spectre RMN ^{13}C du composé **11**

Rapport-Gratuit.com

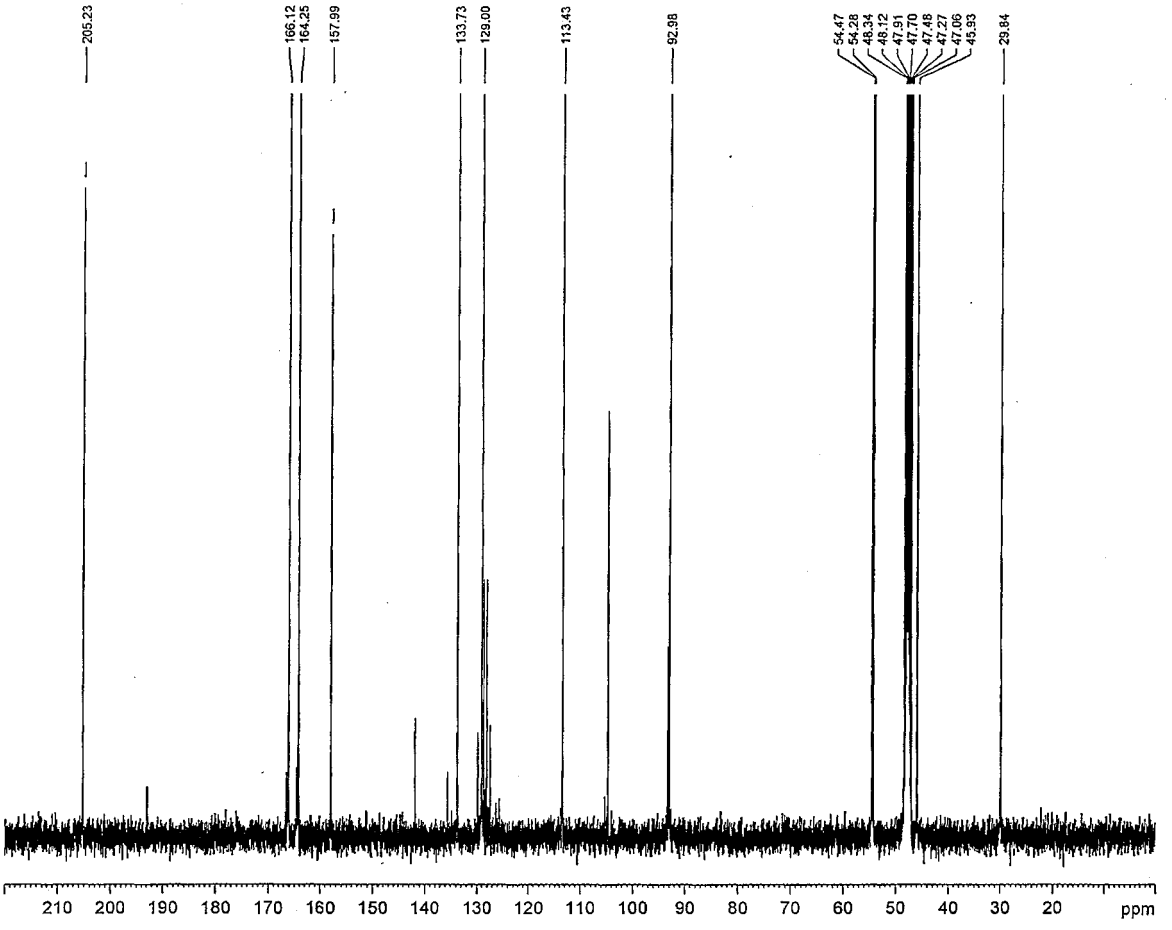


Figure 46 : Spectre RMN ^{13}C du composé **12**

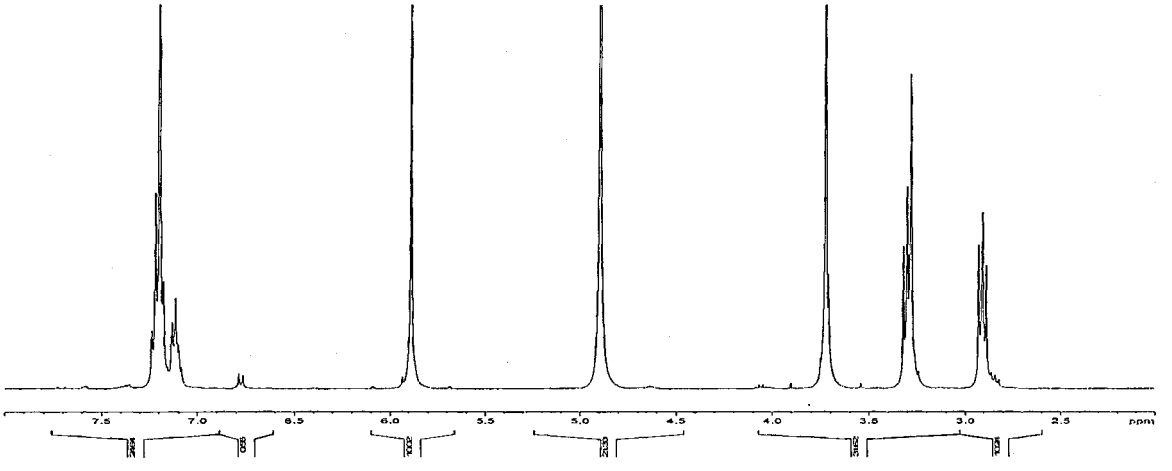


Figure 47 : Spectre RMN ^{1}H du composé **13**

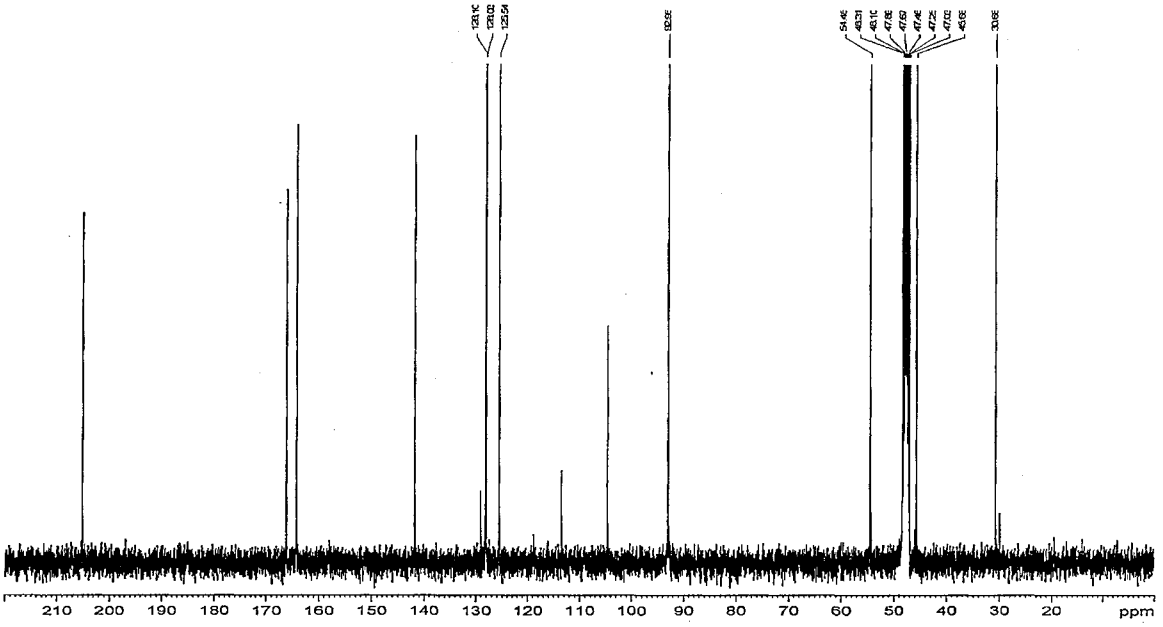


Figure 48 : Spectre RMN ^{13}C du composé **13**

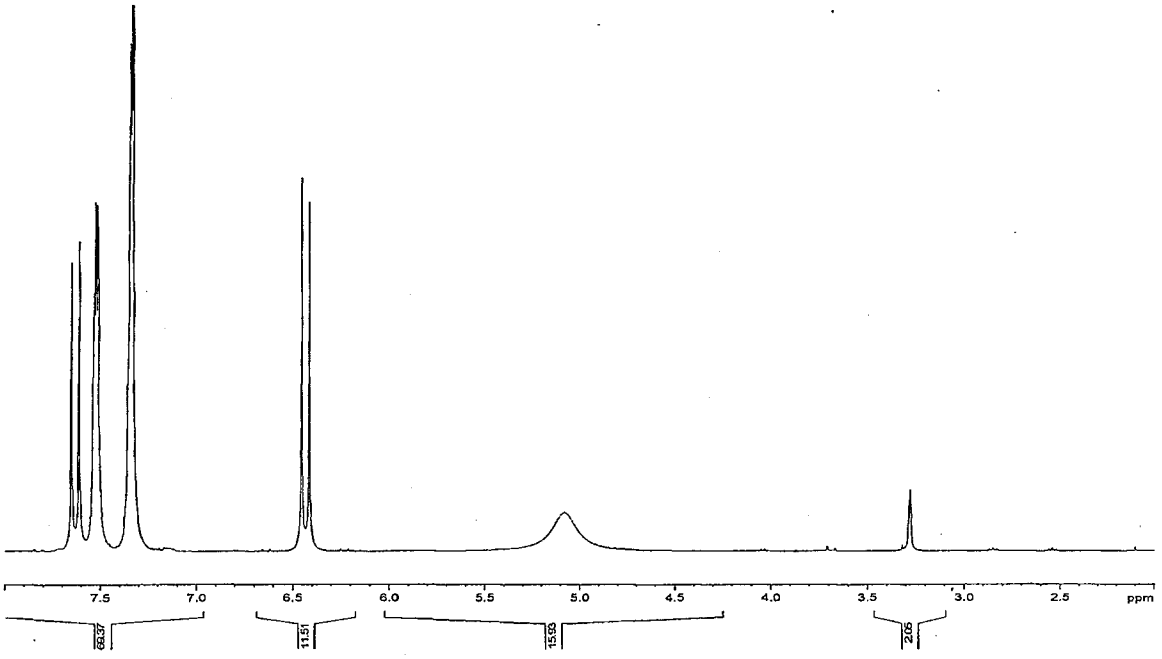


Figure 49 : Spectre RMN ^{1}H du composé **14**

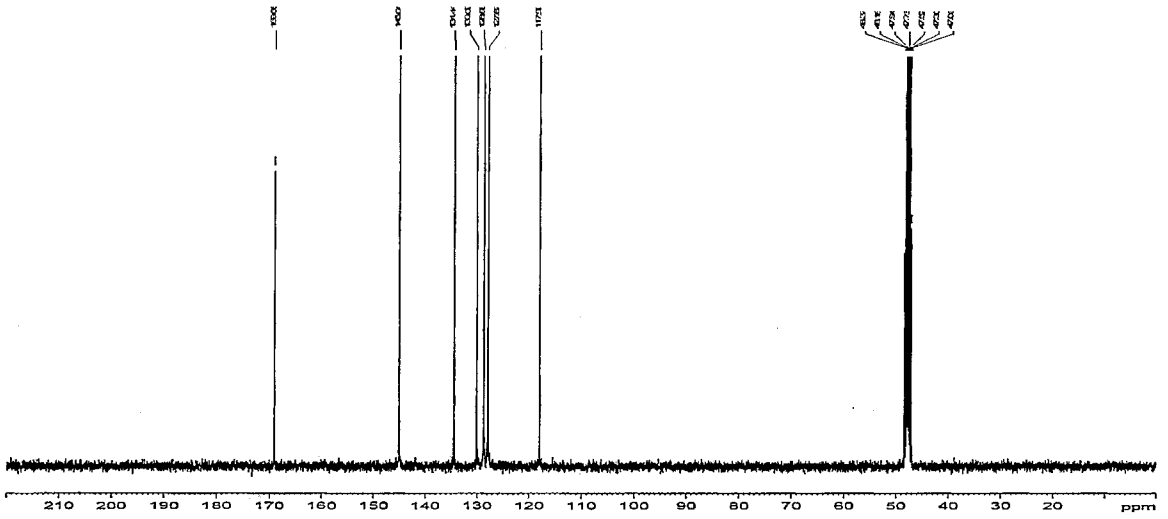


Figure 50 : Spectre RMN ^{13}C du composé **14**

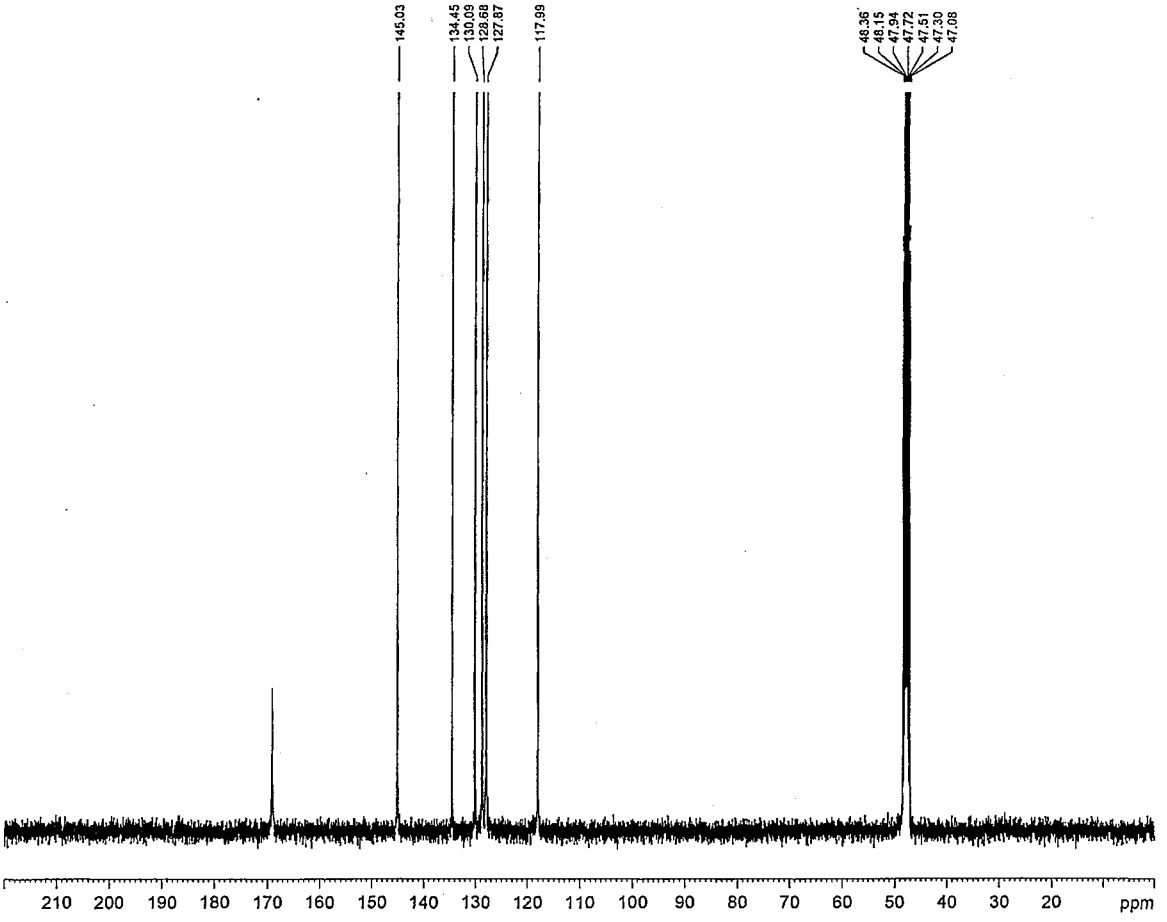


Figure 51 : Spectre RMN ^{13}C du composé **15**

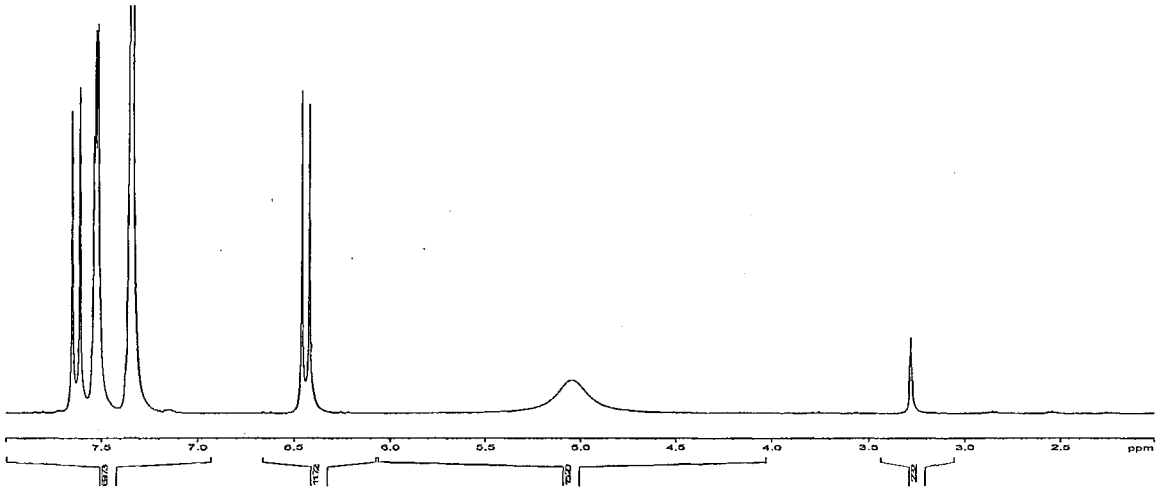


Figure 52 : Spectre RMN ^{1}H du composé **15**

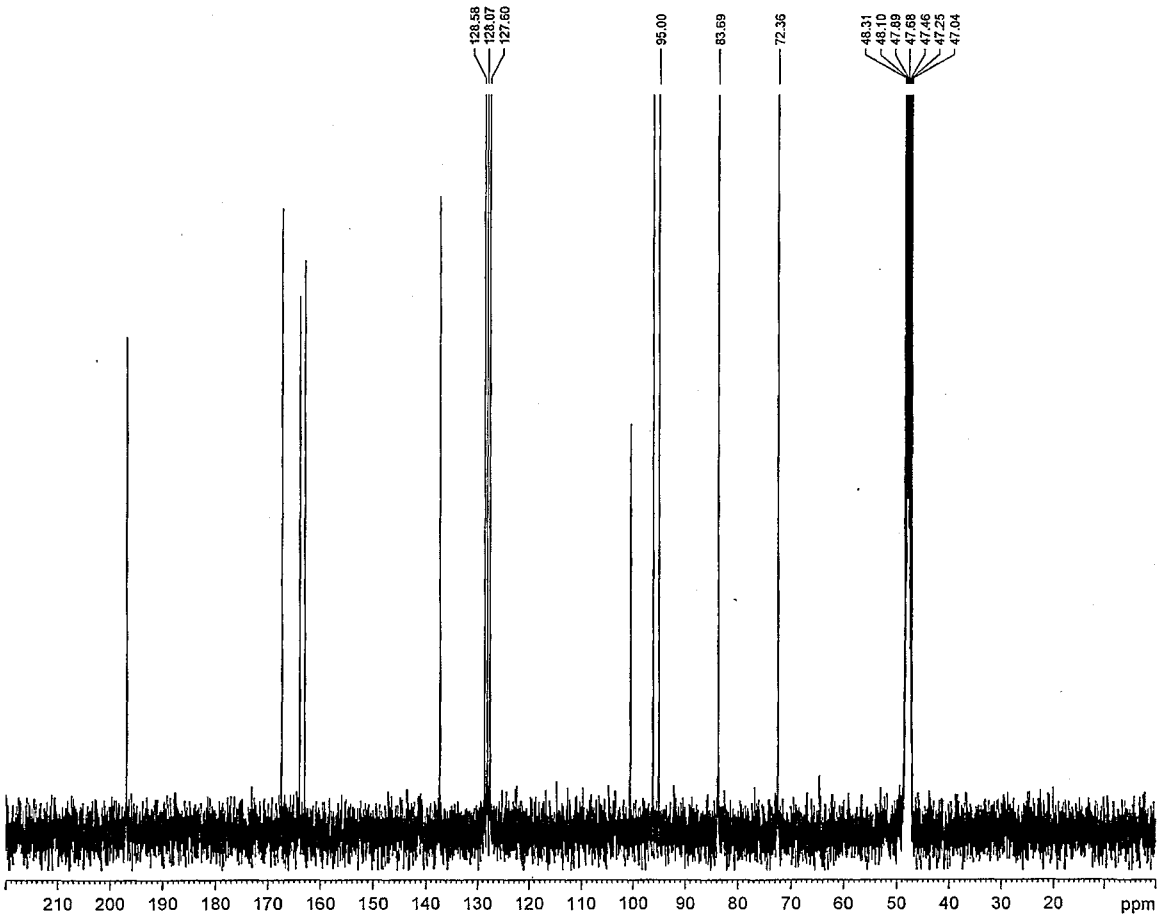


Figure 53 : Spectre RMN ^{13}C du composé **16**

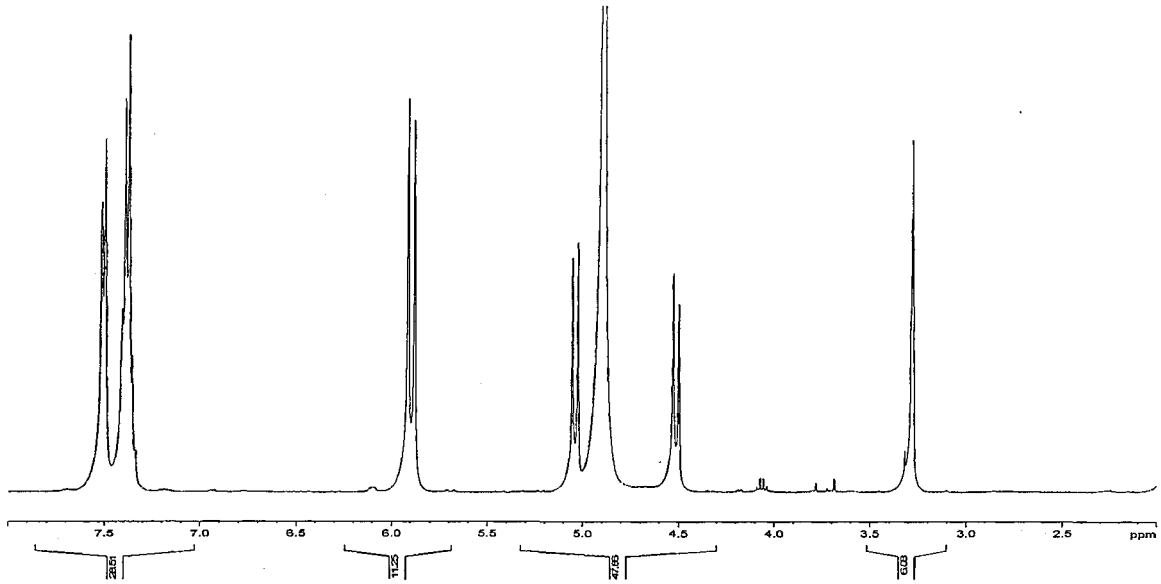


Figure 54 : Spectre RMN ^{1}H du composé **16**

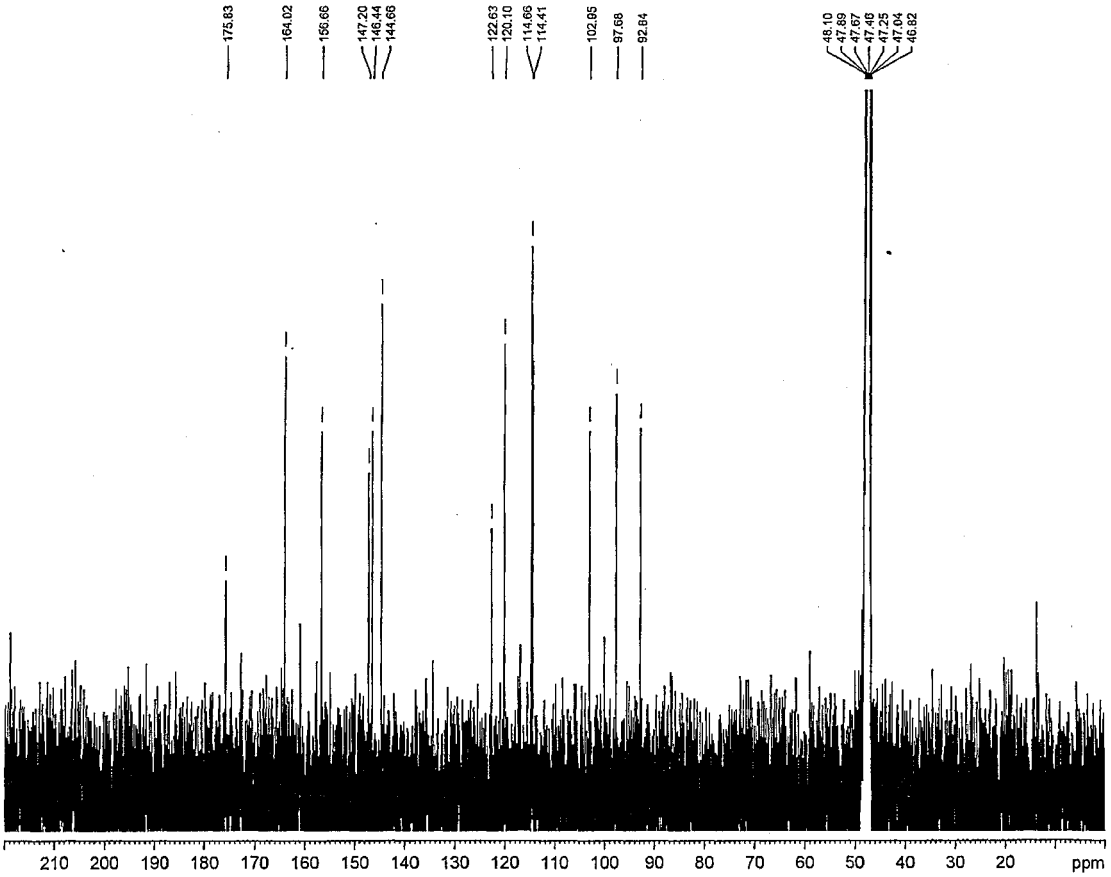


Figure 55 : Spectre RMN ^{13}C du composé **17**

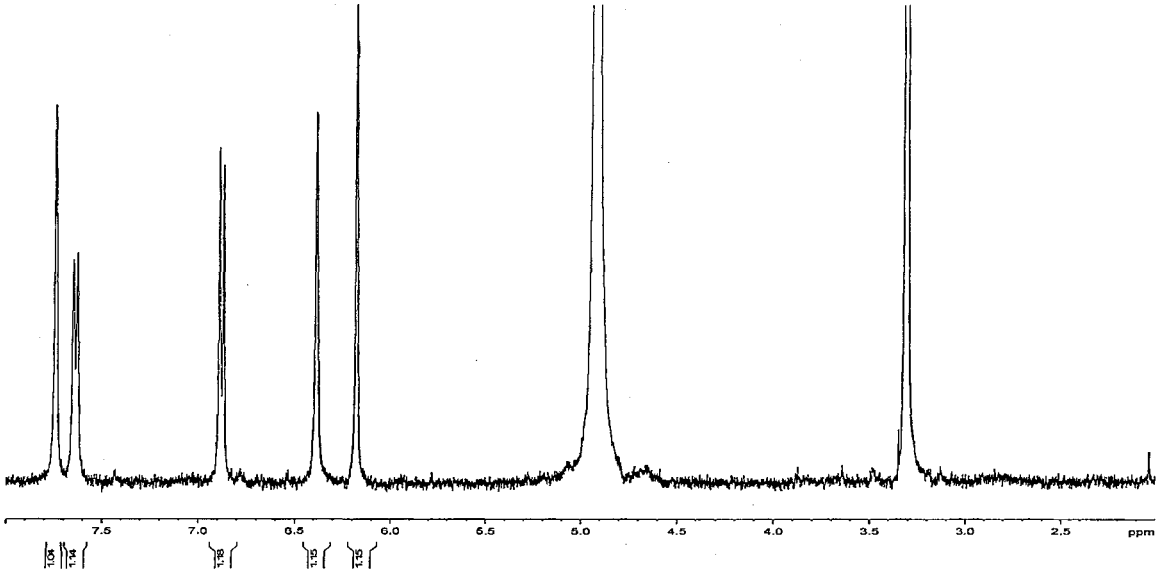


Figure 56 : Spectre RMN ^{1}H du composé **17**

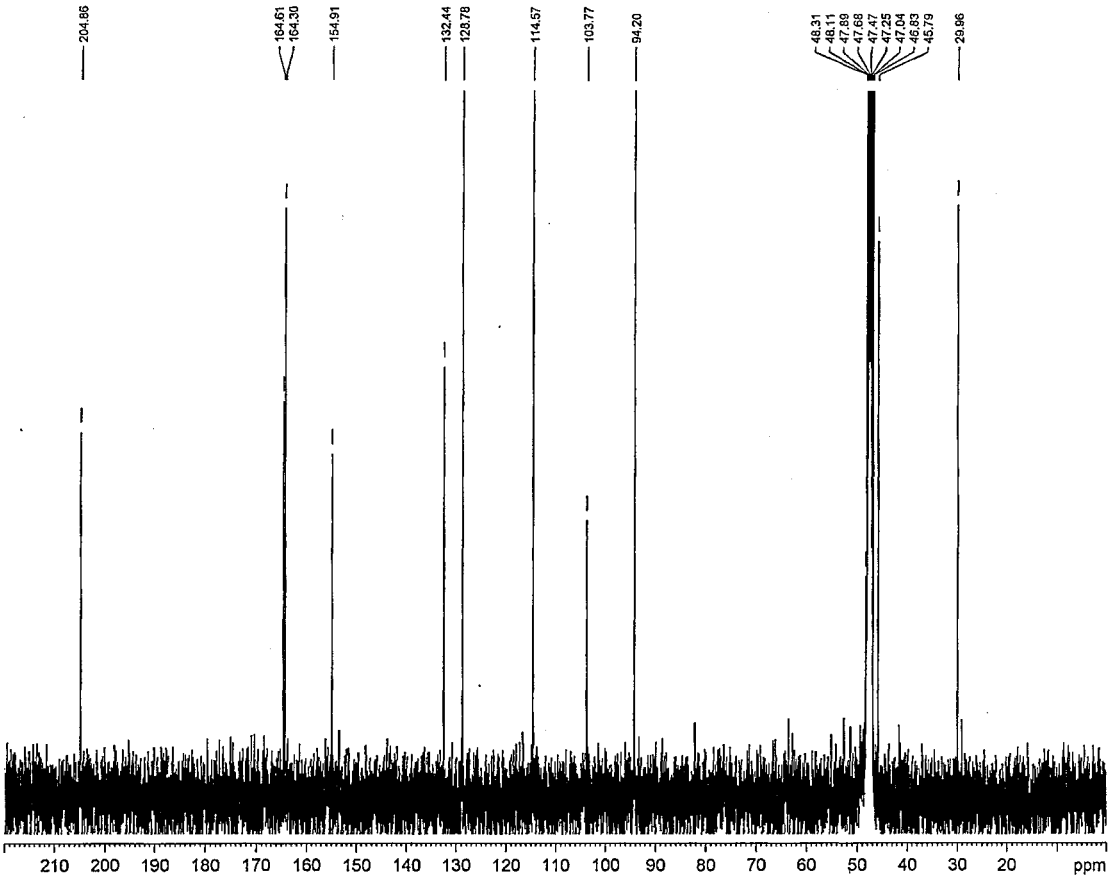


Figure 57 : Spectre RMN ^{13}C du composé **18**

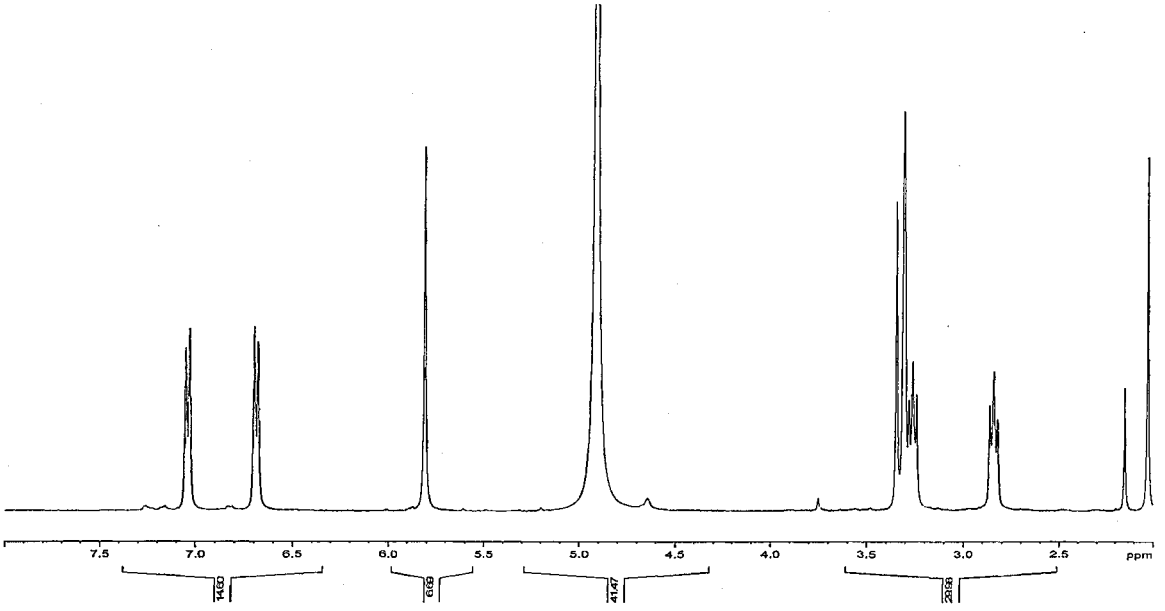


Figure 58 : Spectre RMN ^{1}H du composé **18**

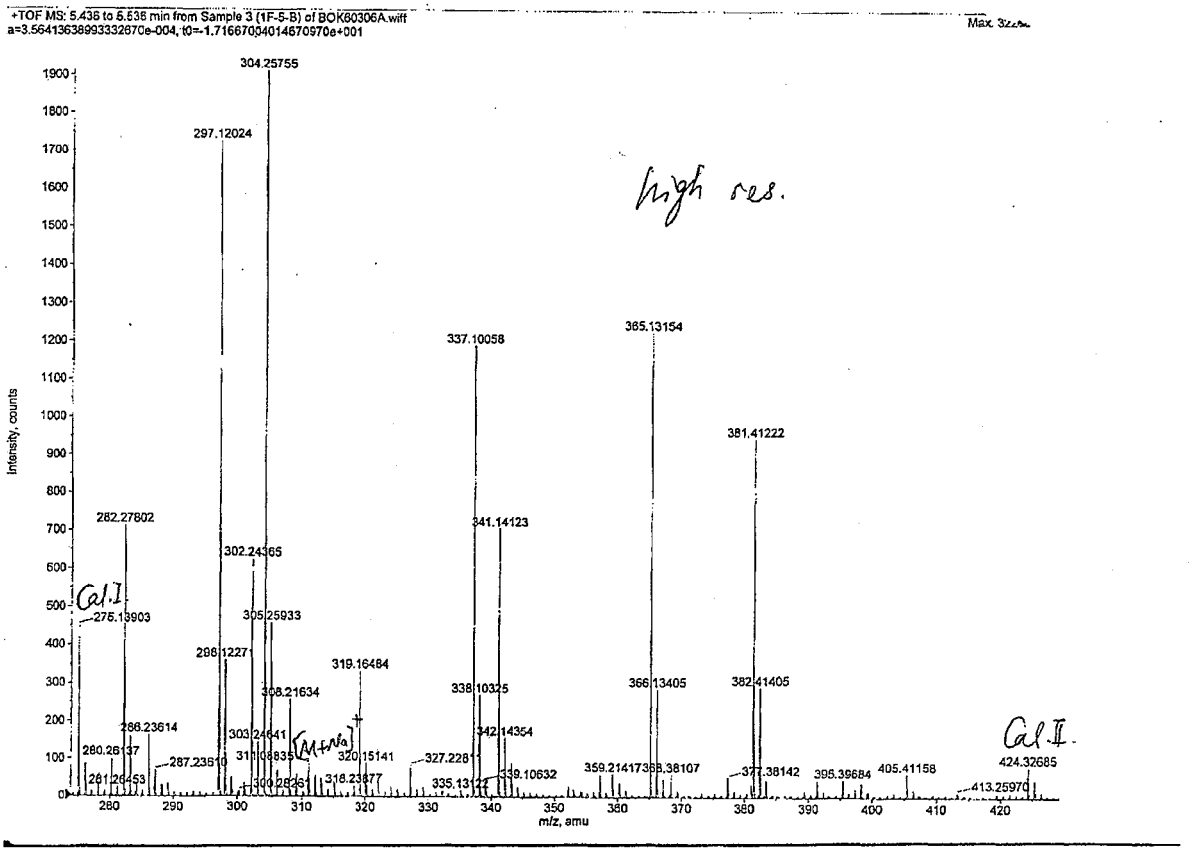


Figure 59 : Spectre de masse du composé **11**

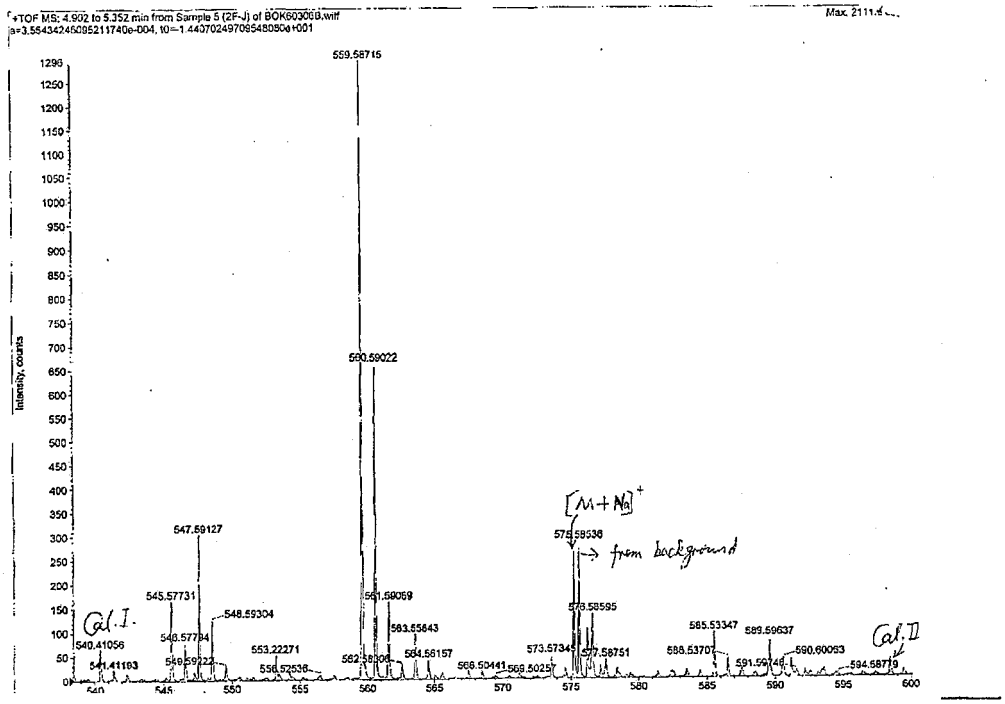


Figure 60 : Spectre de masse du composé inconnu **2F-J**

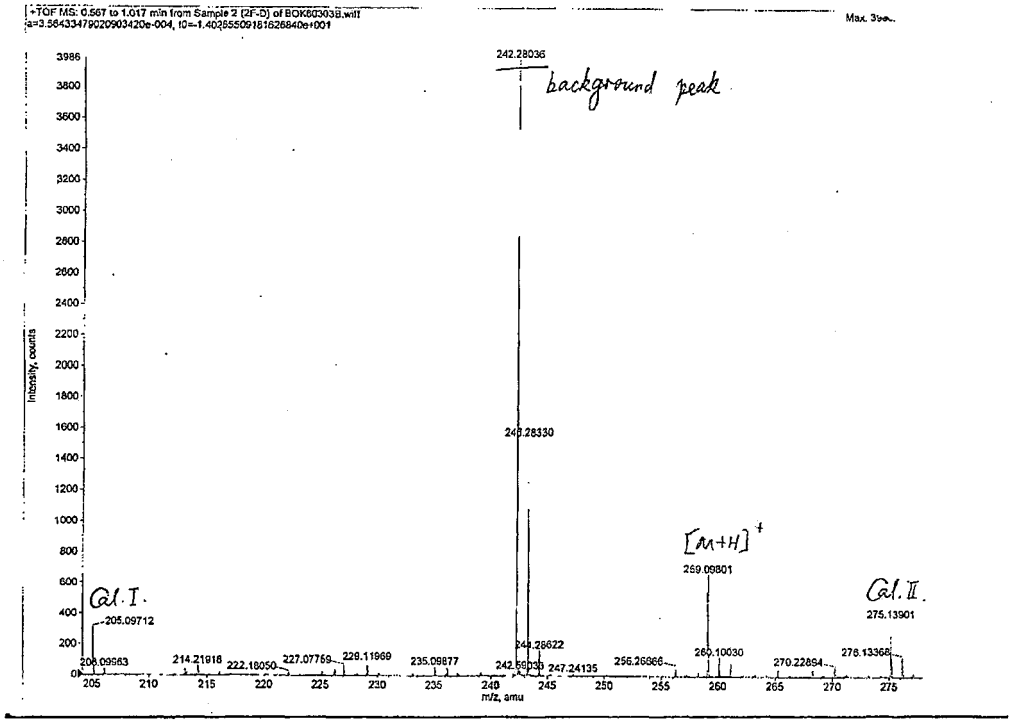


Figure 61 : Spectre de masse du composé **3**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

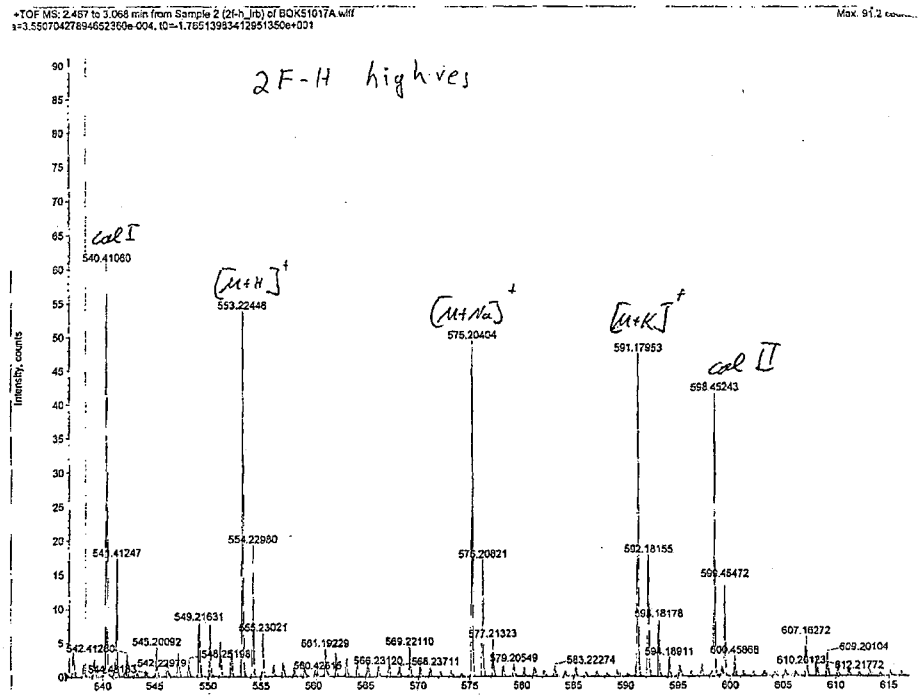


Figure 62 : Spectre de masse du composé **8**

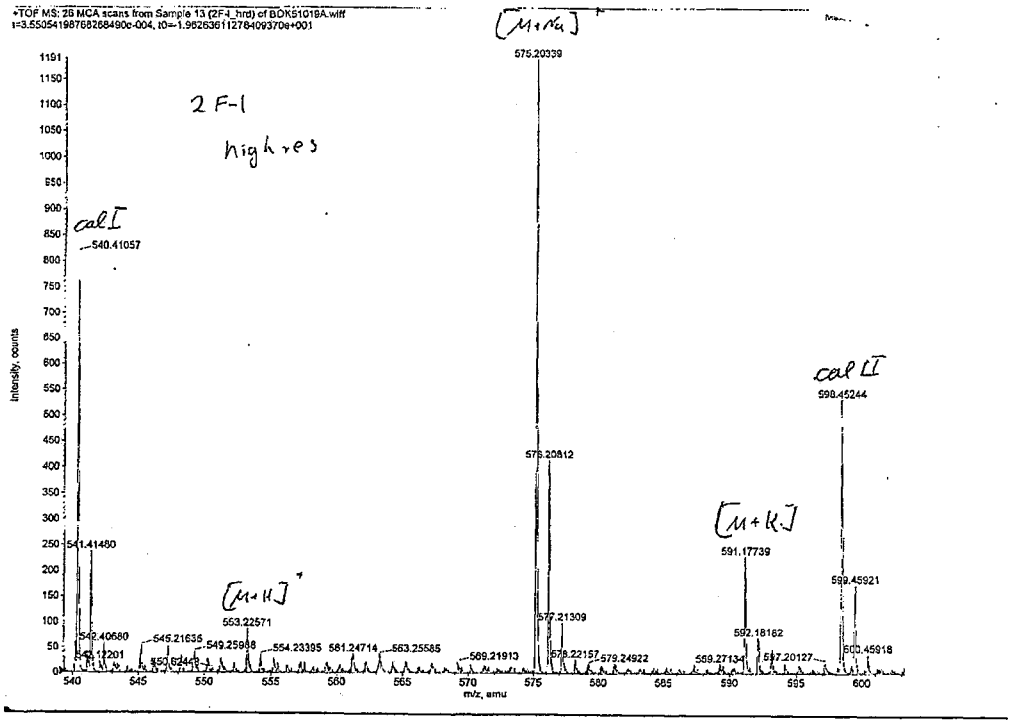


Figure 63 : Spectre de masse du composé **9**