

UNIVERSITE DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

SYLVAIN MERCIER

B. Sc. (CHIMIE)

ISOLATION ET CARACTÉRISATION DE COMPOSÉS BIOACTIFS DE LA RÉSINE
DE SAPIN BAUMIER (*Abies balsamea* (L.) Mill)

AOÛT 2013

Résumé

L'exploitation forestière est un important vecteur économique au Québec. La région du Saguenay-Lac-St-Jean compte pour 17% de toute la superficie forestière de la province et en 2008-2009, c'est cette région qui coupait le plus de résineux sur son territoire. Les questionnements concernant la gestion et l'avenir de la forêt québécoise ont entraîné en 2010 la parution du *Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008*. Plusieurs défis à relever pour les années futures y sont énoncés, plus particulièrement celui de déterminer le potentiel économique et biologique des produits forestiers non ligneux (PFNL). Le développement de produits biopharmaceutiques (ainsi que nutraceutiques et cosméceutiques) est de loin la voie de valorisation privilégiée pour les PFNL. Il est intéressant de souligner que 25 à 50% des médicaments présentement sur le marché mondial proviennent de sources naturelles.

L'objectif du projet de recherche proposé est d'approfondir les connaissances sur l'exsudat d'une espèce de la forêt boréale : le sapin baumier (*Abies balsamea*). Les précédentes recherches du laboratoire LASEVE ont démontré le potentiel de ce PFNL en tant que source de nouvelles structures de molécules ainsi que pour l'exploitation des propriétés cytotoxiques et antibiotiques de certains de ses extraits. À cet égard, 13 molécules ont été isolées du précipité et du filtrat obtenus après la trituration de la résine de sapin baumier dans l'hexane, soit l'acide (24E)-3 α -hydroxy-23-oxocycloart-24-èn-26-oïque, l'acide 3 α -hydroxy-23-oxocycloart-25(27)-èn-26-oïque, l'acide (25R)-3,4-seco-9 β H-lanosta-4(28),7-diène-3,26-dioïque, l'acide (24E)-3,4-seco-9 β H-lanosta-4(28),7,24-triène-3,26-dioïque, l'abiesanordine C, le méthyl 13-oxo-podocarp-8(14)-èn-15-oate, le méthyl 15-hydroxydéhydroabiétate, le (12E)-15-nor-8-hydroxy-12-labdèn-14-al, le 8-hydroxy-14,15-dinor-11-labdèn-13-one, l'acide abiesonique, l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque, l'acide firmanoïque et le 3 β -hydroxy-abiénol.

Parmi ces molécules, trois sont des composés rapportés pour la première fois dans la littérature. Certains extraits bruts sont particulièrement actifs comme le précipité et le filtrat hexane qui possèdent une bonne activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* après 6h, soit de $2,7 \pm 0,5$ μ g/ml et de $2,3 \pm 0,4$ μ g/ml respectivement ainsi que certaines autres fractions non travaillées exprimant des IC₅₀ sur la même bactérie de $2,87 \pm 0,09$ et de $3,5 \pm 0,8$ μ g/ml. L'acide 3 α -hydroxy-23-oxocycloart-25(27)-èn-26-oïque et l'acide firmanoïque ont été reconnus comme étant légèrement antibactériens sur *S. aureus* avec une IC₅₀ après 6h de respectivement 8 ± 1 et $4,6 \pm 0,1$ μ M. Le précipité provenant de l'oléorésine possède une bonne activité cytotoxique pour un extrait brut, soit de 30 ± 3 μ g/ml sur les cellules cancéreuses du poulmon (A-549) et de 31 ± 2 μ g/ml sur les cellules cancéreuses du colon (DLD-1). Parmi les molécules non rapportées dans l'article scientifique, l'acide firmanoïque est la molécule qui démontre l'effet cytotoxique le plus marqué avec une valeur de 66 ± 4 μ M sur les cellules A-549 et de 58 ± 5 μ M sur les cellules DLD-1.

En conclusion, les nouvelles découvertes sur cette résine s'inscrivent dans l'optique de la valorisation de la recherche sur les PFNL, objectif énoncé dans le *Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008*.

Remerciements

Je désire premièrement remercier mon directeur, le Dr. André Pichette pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et m'avoir fait confiance dans l'atteinte des objectifs fixés. Cette expérience enrichissante m'a permis de développer ma capacité d'analyse et mes connaissances dans le domaine des produits naturels d'une manière inespérée. Je tiens aussi à adresser mes remerciements à mon co-directeur, le Dr. Jean Legault pour sa collaboration toujours aussi précieuse tant au niveau des analyses biologiques que lors de mes recherches de stage. Un grand merci à vous deux.

Merci au Fonds de développement académique du réseau (FODAR) pour le soutien financier accordé par le biais de la bourse Pharmaqam.

Je veux aussi souligner l'apport de plusieurs personnes dans la réussite de ce projet:

- M. Vakhtang Mshvildadze pour ses connaissances appliquées dans le domaine chromatographique et pharmacognostique;
- Mme. Carole Grenon pour sa grande expérience au niveau technique et son aide toujours appréciée;
- M. Serge Lavoie pour son excellence en analyse RMN, pour ses nombreux conseils, pour son énergie et sa passion;
- Mme. Catherine Dussault et M. Karl Lalancette pour tout le domaine des analyses biologiques;

- Mme Maria Deshayes, stagiaire guadeloupéenne, pour sa bonne humeur de tous les jours et son rire contagieux;
- Mme. Laurie Caron, pour son amitié, pour son écoute ainsi que pour toutes les discussions que nous avons eues tout au long de ce parcours.

En terminant, un remerciement tout spécial à M. Maxime St-Pierre qui a su quotidiennement me supporter, m'encourager et m'écouter durant toutes ces années.

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des annexes	ix
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Problématique.....	2
1.2 Objectifs	6
1.2.1 Objectif général	6
1.2.2 Objectifs spécifiques.....	6
Chapitre 2 – Revue de littérature	7
2.1 Description physique	8
2.2 Distribution	9
2.3 Utilisations	9
2.4 Composition chimique du genre <i>Abies</i>	11
2.5 Activités biologiques du genre <i>Abies</i>	17
2.6 Composition chimique et activités biologiques d' <i>Abies balsamea</i>	19
2.7 Utilisations actuelles de la résine et état des connaissances.....	26
Chapitre 3 – Article scientifique.....	28
Lanostane- and cycloartane-type triterpenoids from <i>Abies balsamea</i> oleoresin.....	30
Chapitre 4 – Avancement des travaux	37
4.1 Choix du solvant pour la trituration de la résine	38
4.2 Schéma d'isolation général.....	40
4.3 Isolation de l'acide abiesonique	42
4.4 Isolation de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque et de l'acide firmanoïque	43
4.5 Isolation du 3 β -hydroxy-abiénol.....	46
4.6 Activités biologiques des molécules isolées.....	48

Chapitre 5 - Conclusion.....	52
Chapitre 6 - Références	55
Chapitre 7 - Annexes	60

Liste des tableaux

Tableau 1 – Nombre de composés isolés du genre <i>Abies</i> par type de squelette carboné selon Yang, X.W., <i>et al</i> , 2008	12
Tableau 2 – Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Abies balsamea</i>	21
Tableau 3 - Données RMN du 3 β -hydroxy-abiénol et de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E - dièn-26-oïque.....	45
Tableau 4 – Activités cytotoxiques des fractions brutes et des molécules pures isolées	49
Tableau 5 – Activités antibactériennes des fractions brutes et des molécules pures isolées.....	50

Liste des figures

Figure 1 – <i>Taxus canadensis</i> (a) et <i>Panax quinquefolius</i> (b).....	33
Figure 2 – Aiguilles, cônes et écorce du sapin baumier.....	8
Figure 3 - Distribution du sapin baumier en Amérique du Nord	9
Figure 4 – Squelette de base des terpènes isolés du genre <i>Abies</i>	13
Figure 5 – Principaux flavonoïdes et phénols isolés du genre <i>Abies</i>	14
Figure 6 – Stéroïls et autres molécules isolées du genre <i>Abies</i>	15
Figure 7 – Tétraterpènes isolés de <i>A. fabri</i>	16
Figure 8 – Molécules isolées du genre <i>Abies</i> présentant une activité biologique.....	18
Figure 9 – Juvabione, juvabiol et déhydrojuvabione	20
Figure 10 – Mono- et sesquiterpènes identifiés et/ou isolés dans la résine	24
Figure 11 – Principaux acides résiniques isolés de la résine de sapin.....	25
Figure 12 – Tétraterpènes isolés de <i>A. balsamea</i>	25
Figure 13 – CCM des tests de trituration de la résine.....	39
Figure 14 – Fractionnement du précipité provenant de la trituration de la résine	40
Figure 15 – Molécules supplémentaires isolées de la résine de sapin baumier	42
Figure 16 – Schéma de fractionnement de la fraction BC.1	43
Figure 17 – Schéma de fractionnement de la fraction BC.2	44
Figure 18 – Schéma de fractionnement du filtrat hexane	46

Liste des annexes

Annexe 1 - RMN ^1H de l'acide 3α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque	61
Annexe 2 - RMN ^{13}C de l'acide 3α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque	62
Annexe 3 - RMN ^1H du 3β -hydroxy-abiénol	63
Annexe 4 - RMN ^{13}C du 3β -hydroxy-abiénol	64
Annexe 5 – Liste des abréviations.....	65

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Problématique

La forêt est un important vecteur économique pour le Québec ainsi que pour le Saguenay-Lac-St-Jean. Cette région compte pour 17% de toute la superficie forestière de la province et en 2008-2009 c'est à cet endroit qu'on coupait le plus grand volume de résineux dans les forêts publiques (Parent 2010). La grande majorité de toutes ces récoltes est destinée à l'industrie du bois d'œuvre ainsi qu'à celle des pâtes et papier. Les questionnements vis-à-vis la gestion et l'avenir de ce bien essentiel à l'économie du Québec ont entraîné la parution du *Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008*. Ce document vise à informer la population québécoise sur les questions relatives à la forêt ainsi qu'à la durabilité de l'aménagement forestier (Gassama *et al.* 2010). Plusieurs défis à relever pour les années futures y sont énoncés, plus particulièrement celui de déterminer le potentiel économique et biologique des produits forestiers non ligneux (PFNL) afin de pouvoir améliorer l'état des connaissances actuelles.

Les PFNL sont, par définition, des biens d'origine biologique, autre que le bois, qui proviennent des forêts ou d'autres terrains boisés (Turgeon 2003). Ces produits peuvent se classer dans quatre grandes catégories soit les produits d'alimentation (érable, bleuets, champignons), les produits ornementaux (arbres de Noël), les produits pharmaceutiques/cosmétiques (if, ginseng) et les produits manufacturiers et les matériaux (huiles essentielles, résines). Même si la récolte des PFNL s'intensifie depuis quelques années, peu de données précises sur la contribution de cette industrie à l'économie canadienne sont disponibles. Quelques petites et moyennes entreprises du

Saguenay-Lac-St-Jean font déjà des incursions dans ce domaine dans le but de diversifier leurs exploitations et leurs revenus et y voient une voie d'avenir prometteuse.

Parmi les quatre grandes classes de PFNL, celle qui attire le plus l'attention ces dernières années est sans contredit la voie des produits pharmaceutiques/cosmétiques. Cet intérêt particulier repose sur plusieurs facteurs tels que l'importance des marchés et le bien-fondé de l'utilisation des produits naturels pour le développement de médicaments. En effet, il est estimé que 25% à 50% des médicaments présentement sur le marché mondial proviennent de sources naturelles (Kingston 2011). Par exemple, le paclitaxel (taxol®), une molécule anticancéreuse isolée de l'écorce de l'if de l'Ouest (*Taxus brevifolia*) et de l'if du Canada (*Taxus canadensis*, figure 1 (a)) est très bien connue et déjà commercialisée mondialement. De plus, le Canada est un important producteur de ginseng (*Panax quinquefolius* figure 1 (b)). Cette plante qui se retrouvait jadis à l'état sauvage est aujourd'hui menacée en raison de son exploitation intensive; c'est pourquoi il doit maintenant être cultivé.



Figure 1 – *Taxus canadensis* (a) et *Panax quinquefolius* (b)
(AAC 2007; AAC 2011).

Le ginseng canadien, grâce à sa teneur en saponines de type ginsenosides, est reconnu pour posséder plusieurs effets médicinaux, en particulier des effets stimulants et adaptogènes. C'est l'une des plantes médicinales les plus consommées dans le monde. À ce titre, n'est-il pas étonnant de constater que le Canada en a exporté 2890 tonnes en 2007, et ce en grande partie vers les pays asiatiques (AAC 2007).

Le *Taxus canadensis* et le *Panax quinquefolius* sont des exemples intéressants qui permettent de démontrer le grand potentiel de l'exploitation des PFNL du Québec et du Canada. Dans l'immensité de la forêt québécoise, on retrouve quelques 1875 plantes vasculaires propres à cette région et de celles-là, une infime partie ont déjà été étudiées chimiquement (Gagnon 2004). L'objectif du projet de recherche proposé est d'approfondir les connaissances sur l'exsudat d'une espèce très connue de la forêt boréale : le sapin baumier (*Abies balsamea*). Les précédentes recherches du laboratoire LASEVE ont démontré l'énorme potentiel de ce PFNL qu'est la résine de sapin baumier en tant que source de nouvelles structures de molécules ainsi que par les propriétés cytotoxiques et antibiotiques de certains de ses extraits. Le laboratoire est aussi bien au fait des usages du sapin en médecine traditionnelle amérindienne. Ces informations indiquent que la résine de conifères du genre *Abies* possède plusieurs activités biologiques, mais en particulier une activité antibactérienne (Moerman 1998; Termentzi *et al.* 2011). À titre d'exemples, la tribu des Iroquois l'utilisait comme cataplasme anticancéreux tandis que la tribu des Micmacs l'utilisait pour le traitement du rhume et pour le soulagement des brûlures (Moerman 1998).

L'exploration de la composition chimique et du potentiel biologique de la résine de sapin baumier se fonde en partie sur les recherches préalablement effectuées par le laboratoire LASEVE. Ces travaux avaient déjà permis de détecter certaines activités biologiques d'intérêt et avaient menés à l'isolation de quelques composés des fractions les plus polaires de la résine. C'est donc sur ces bases préliminaires qu'a débuté mon projet de recherche.

Les nouvelles découvertes sur cette résine s'inscrivent dans l'optique de la valorisation de la recherche sur les PFNL, objectif énoncé dans le *Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008*.

1.2 Objectifs

1.2.1 Objectif général

- Isoler et caractériser les composés bioactifs de la résine de sapin baumier.

1.2.2 Objectifs spécifiques

Dans le but de réaliser l'objectif général du projet, plusieurs étapes doivent être effectuées. En voici le descriptif :

- Fractionner grossièrement la résine de sapin baumier à l'aide de la chromatographie sur colonne de gel de silice;
- Évaluer les activités antibactériennes et cytotoxiques des fractions obtenues;
- Isoler et caractériser les composés responsables de l'activité des fractions bioactives en utilisant des techniques chromatographiques et spectroscopiques modernes.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Description physique

Le sapin baumier est un conifère pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur. Ses aiguilles mesurent de 13 à 20 mm et ses cônes sont longs de 6 à 10 cm, violacés et très résineux (figure 2). Ils arrivent à maturité dès l'automne de la première saison et la floraison de l'arbre est printanière. Il peut aussi se multiplier par marcottage naturel. En effet, lorsque les branches basses de l'arbre touchent le sol, elles peuvent s'enraciner pour donner naissance à d'autres individus. L'écorce du sapin baumier est quant à elle recouverte de vésicules résinifères qui contiennent une substance nommée « Baume du Canada » qui est en fait une oléorésine très odorante (Marie-Victorin 2002). Ce conifère peut vivre jusqu'à 150 ans, mais vit en moyenne 80 ans (Gagnon 2004).



Figure 2 – Aiguilles, cônes et écorce du sapin baumier (Tigner 2011).

2.2 Distribution

Le sapin baumier peut pousser partout, mais il affectionne surtout les lieux froids et humides. C'est l'un des résineux les plus vigoureux comme le démontre bien son aire de répartition qui s'étend jusqu'au 58^e parallèle, rivalisant ainsi avec l'épinette noire et le mélèze laricin pour ce qui est de la dispersion septentrionale (figure 3). On le retrouve exclusivement en Amérique du Nord.

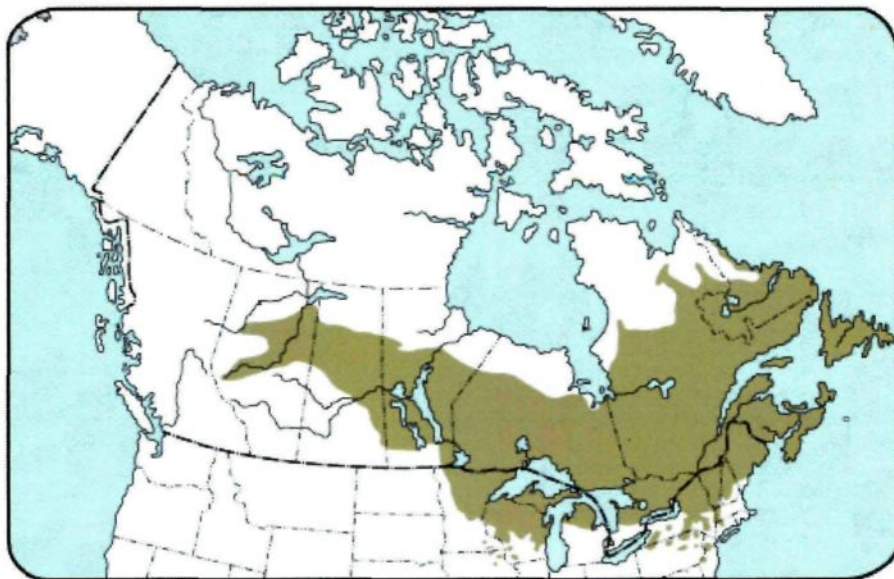


Figure 3 - Distribution du sapin baumier en Amérique du Nord (NRC 2013).

2.3 Utilisations

La première utilisation du sapin baumier qui est probablement aussi la plus évidente est son usage en tant qu'arbre de Noël. Le Québec est un grand producteur de sapins de Noël et c'est le plus grand exportateur d'arbres au Canada avec 779 223 arbres exportés en

2009, soit 46% de la part des exportations canadiennes. La somme des recettes de l'industrie des sapins de Noël au Canada s'élève à 59,4 millions de dollars en 2009 (StatCan 2010).

Le bois de sapin baumier est léger, mou et assez blanc; c'est pourquoi il est seulement utilisé pour des usages secondaires (instruments de musique par exemple). Par contre, le sapin compte à lui seul pour un quart de la production de bois destiné à la fabrication de pulpe pour l'industrie papetière (Marie-Victorin 2002). Une autre utilisation, un peu moins connue cependant, est l'obtention du « Baume du Canada » qui est en fait constitué de l'oléorésine contenue dans les vésicules résinifères qui recouvrent le tronc de l'arbre (au Québec cette résine porte souvent l'appellation de « gomme de sapin »). Ce baume est utilisé dans le domaine de l'optique pour l'assemblage des lentilles et pour la préparation des lames de microscope en raison de son indice de réfraction très près de celui du verre (Marie-Victorin 2002).

Du côté ethnobotanique, la médecine traditionnelle canadienne française avait pour habitude d'utiliser la « gomme de sapin » en guise de médicament antiscorbutique, antiseptique pour les plaies et pour apaiser les brûlures (Marie-Victorin 2002). Dans son livre « *Native american medicinal plants : an ethnobotanical dictionary* », Daniel Moerman relate de très nombreux usages ethnobotaniques du sapin baumier. La tribu des Algonquin utilisait la gomme de sapin en cataplasme sur les blessures et morsures d'insectes, les aiguilles comme laxatif sous forme de thé et les racines pour soigner les problèmes cardiaques. Les Iroquois quant à eux utilisaient autant la vapeur d'une décoction

des branches contre les rhumatismes, la résine comme cataplasme anticancéreux et comme traitement pour le rhume ou bien certaines parties de l'arbre non spécifiées pour traiter la tuberculose et la gonorrhée. Dans la tribu Micmac, la gomme était utilisée contre le rhume et pour soulager les brûlures ainsi que pour traiter les plaies et les contusions. Plusieurs autres tribus amérindiennes employaient aussi le sapin baumier pour des usages similaires à ceux mentionnés ci-haut (Moerman 1998).

2.4 Composition chimique du genre *Abies*

Le genre *Abies* compte 46 espèces différentes réparties à travers le monde dont seulement 9 se retrouvent en Amérique (Marie-Victorin 2002; Mabberley 2008). De ces 46 espèces, 19 ont été investiguées à ce jour concernant leur composition chimique. En date de 2008, il était possible de dénombrer selon la revue de littérature effectuée par Yang, X.W. *et al*, quelques 277 composés différents isolés du genre *Abies*. Il s'agit principalement de terpènes, mais aussi de flavonoïdes, lignanes, acides gras et stéroïdes. Le tableau 1 présente un résumé de ces composés en explicitant le nombre de composés isolés par type de squelette carboné.

Les triterpènes isolés sont principalement de type lanostane (1) et, sans tous les nommer, en voici quelques exemples : les acides firmanoïque, isofirmanoïque, sibirique, abiesonique et abiesolidique isolés de *A. sibirica* et les acides mariesii A, B et C isolés de *A. mariesii*. Il y a également des triterpènes de type cycloartanes (2) et d'autres de la famille des 3,4-secocycloartanes (3), gammaceranes (4) et hopanes (5).

Tableau 1 - Nombre de composés isolés du genre *Abies* par type de squelette carboné selon Yang, X.W., *et al*, 2008.

Classe	Type de squelette carboné	Nombre de composés isolés
Triterpènes	Lanostane	58
	Cycloartane	9
	3,4-seco-cycloartane	1
	Gammacerane	4
	Hopane	2
Diterpènes	Labdane	13
	Abietane	23
	Pimarane	1
Sesquiterpènes et monoterpènes	Sesquiterpène acyclique	4
	Germacrane	1
	Humulane	4
	Himachalane	6
	Guaiane	3
	Dodecane	3
	Bisabolane	31
	Eudesmane	10
	Cadinane	3
	Autre sesquiterpène	3
	Monoterpène*	1
Flavonoïdes	Flavone	20
	Biflavone	1
	Chalcone	4
Lignanes	8-O-4'-néolignane	1
	Ditétrahydrofurane	2
	4-phényltétrahydronaphtalène	5
	Benzo furane	5
	Dibenzylbutane	24
	Dibenzylbutyrolactone	6
Phénols		16
Stéroïdes	Sitostérol	1
	Cholestane	4
	Ergostane	2
Autres**		6

* Plusieurs centaines de monoterpènes ont été identifiés dans les 19 espèces d'*Abies*, mais seulement un a été réellement isolé.

** Cette catégorie regroupe une cycloheptanone, une pyrone, deux acides gras et deux alcools gras.

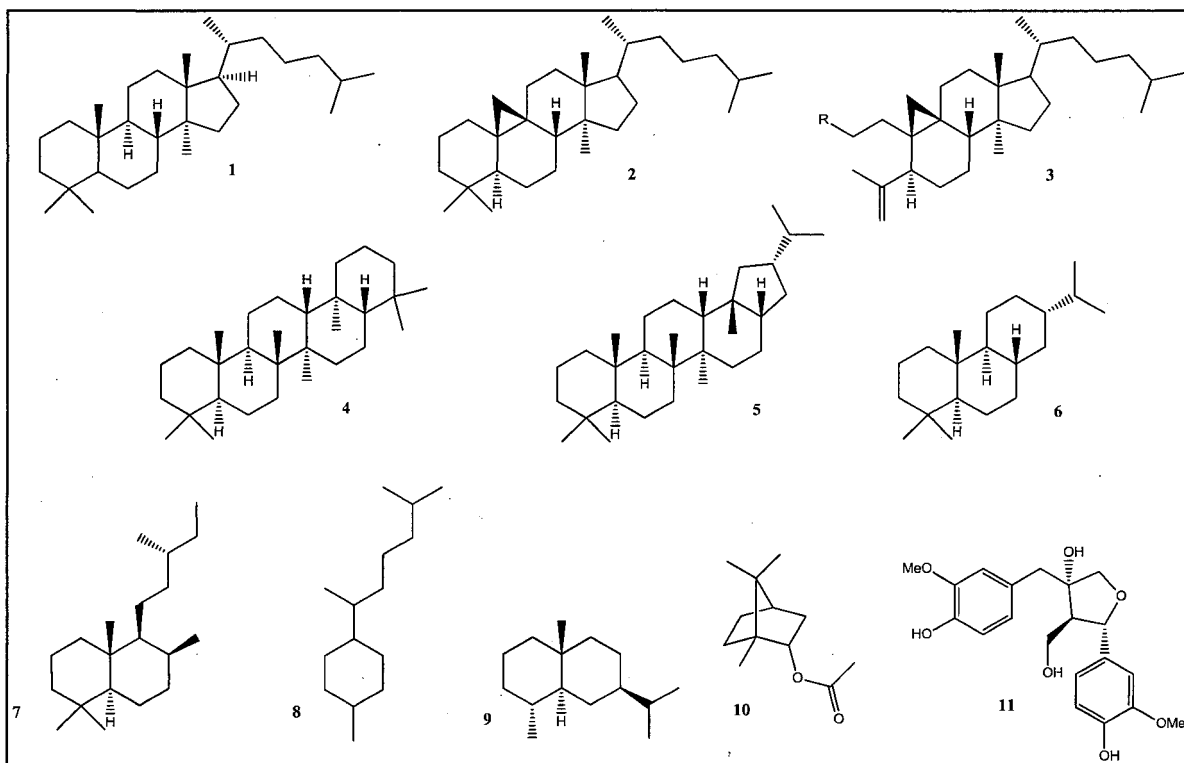


Figure 4 – Squelette de base des terpènes (1-10) et des lignanes (11) isolés du genre *Abies*.

Les principaux diterpènes sont majoritairement isolés d'*A. marocana* et sont de type abiétane (6) comme l'acide abiétique et le déhydroabiétinol ainsi que de type labdane (7) comme l'abiénol, le manool et l'épimanool. Les sesquiterpènes sont en grande partie formés d'un squelette de type bisabolane (8). Ce groupe de composés qui se retrouve principalement dans *A. sachalinensis* contient entre autre tous les dérivés de la juvabione (juvabiol, epijuvabiol, acide todomatuique, etc.). On retrouve aussi des sesquiterpènes de type eudesmane (9) isolés de *A. firma*. Quant aux monoterpènes, bien que des centaines aient été identifiés dans les différentes fractions volatiles (par GC-MS par exemple), un seul a été réellement isolé dans *A. firma* et il s'agit de l'acétate de bornyle (10).

Les lignanes isolés sont en grande partie de type dibenzylbutane, comme par exemple l'olivil (**11**), et ont été retrouvés dans plusieurs espèces d'*Abies* différentes.

Pour ce qui est des flavonoïdes, le squelette le plus rencontré est celui de type flavone retrouvé dans *A. amabilis*. Ces molécules sont souvent glycosylées : glycosides de kaempférol (**12-15**), de quercétine (**16-19**), de laricitrine (**20-23**), d'isorhamnétine (**24-26**) et de myricétine (**27**). Mentionnons aussi que l'okanine (**28**) et trois autres chalcones glycosylées (**29-31**) ont été isolées des tiges d'*A. pindrow* (Tiwari and Minocha 1980).

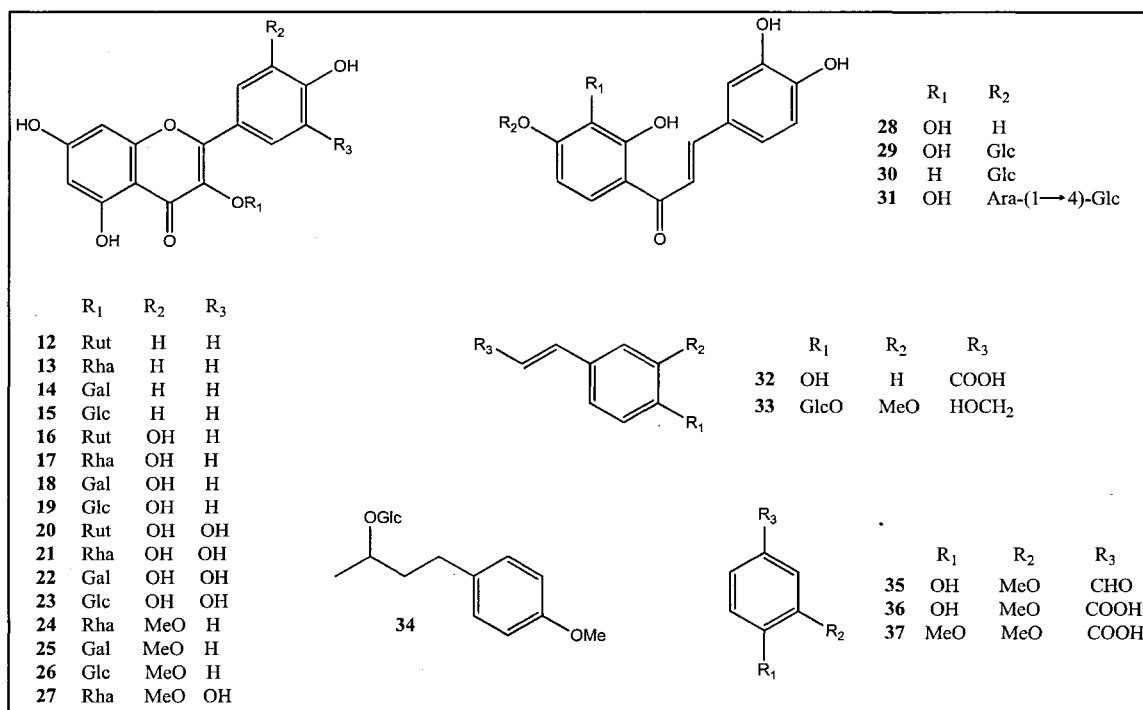


Figure 5 – Principaux flavonoïdes et phénols isolés du genre *Abies*.

Seize phénols sont répertoriés pour le genre *Abies*. Parmi ceux-ci on retrouve l'acide coumarique (32), l'abiétine (33), le bétuloside de méthyle (34), la vaniline (35), l'acide vanilique (36) et l'acide veratrique (37).

Du côté des stéroïdes, le β -sitostérol (38) a été identifié dans plusieurs espèces d'*Abies* tandis que les quatre cholestanes (le glucoside de β -sitostérol (39), le β -palmitate de sitostéryle (40), la β -sitosténone (41) et le 3 β -hydroxy-7-oxocholest-5-ène (42)) ont été isolées respectivement d'*A. koreana* pour le premier, d'*A. sachalinensis* pour les deux suivants et d'*A. marocana* pour le dernier. Soulignons aussi l'identification du maltol (43), du (+)-pinitol (44) et de l'acide oléique (45).

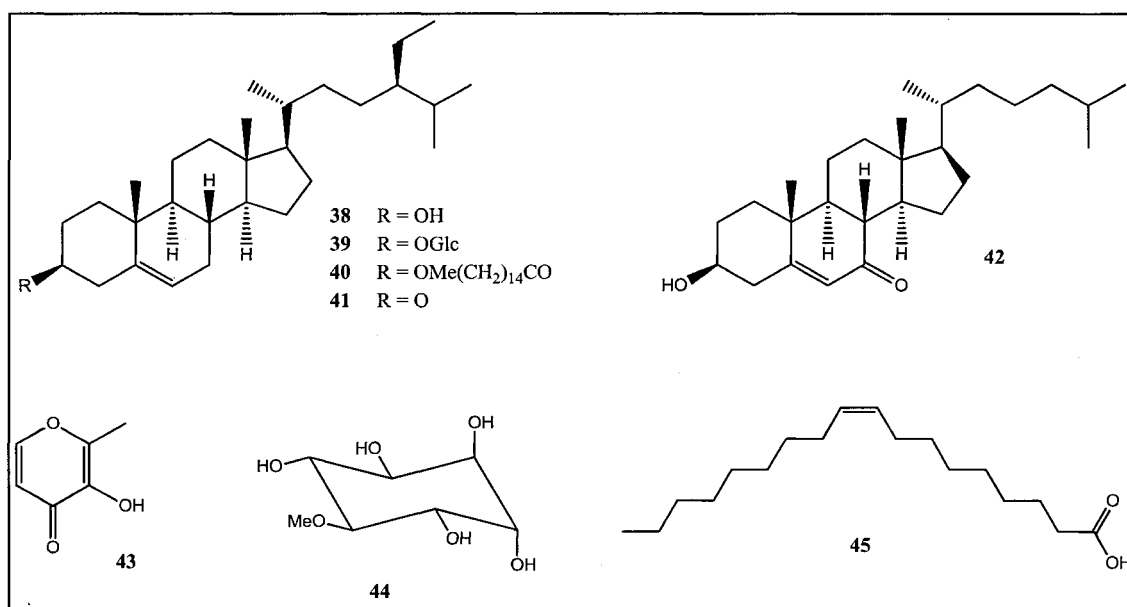


Figure 6 – Stéroïds et autres molécules isolées du genre *Abies*.

Récemment, deux nouvelles molécules comportant un squelette carboné très particulier ont été isolées et identifiées des parties aériennes d'*A. fabri* (Li *et al.* 2012). Les deux molécules en question (46-47) appartiennent en fait à la classe des tétraterpènes non caroténoïdiques, une classe de molécules extrêmement rares et peu connues dans le règne végétal. Contrairement aux tétraterpènes de type caroténoïdiques (carotènes, lycopène, lutéine, etc.), ces molécules ne possèdent pas nécessairement de symétrie bilatérale et sont souvent hautement cyclisées (Zhang *et al.* 2005).

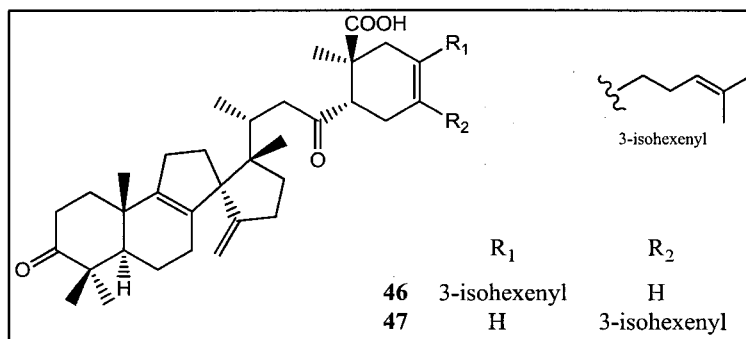


Figure 7 – Tétraterpènes isolés de *A. fabri*.

On compte seulement une trentaine de molécules connues dans cette classe particulière. Il est intéressant de souligner que ce type de composé a été identifié seulement dans une autre espèce végétale que le genre *Abies*, soit l'espèce de palétuvier asiatique *Ceriops tagal* qui contient les tagalsines I et J (Zhang, Lu *et al.* 2005). Quelques autres tétraterpènes non caroténoïdiques ont été isolés de différents animaux marins, principalement de *Sarcophyton spp.*, un genre de corail mou (Kusumi *et al.* 1990; Feller *et al.* 2004; Iwagawa *et al.* 2006; Bishara *et al.* 2007; Lan *et al.* 2009).

En considérant que plus de 30 000 composés terpéniques ont été identifiés à ce jour, il est donc possible de dire que les tétraterpènes non caroténoïdiques ne représentent qu'environ 0,1% de tous les terpènes connus. La découverte de telles molécules représente un apport non négligeable dans l'avancement des connaissances dans le domaine des produits naturels (Connolly and R.A.Hill 1991-a; Breitmaier 2006).

2.5 Activités biologiques du genre *Abies*

Parmi tous les composés recensés dans la section 2.4, certains possèdent des activités biologiques très intéressantes. Plusieurs extraits bruts ont également démontré des activités significatives sans pour autant faire l'objet de travaux visant à identifier les composés responsables des dites activités. L'acide 24-méthylidène-3,4-secocycloart-4(28)-en-3-oïque (**48**), un triterpène isolé d'*A. sibirica* et d'*A. koreana*, possède une forte toxicité envers les lignées de cellules cancéreuses A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2 et HCT-15 avec des valeurs de ED₅₀ de respectivement 2,93; 3,01; 3,18 et 2,96 µg/ml (Yang *et al.* 2008). L'acide abiesolidique (**49**) isolé de *A. sibirica* et de *A. sachalinensis* ainsi que le méthyl (23R,25R)-3,4-seco-9β-lanosta-4(28),7-dien-26,23-olid-3-oate (**50**) isolé d'*A. sachalinensis* sont capable d'inhiber complètement la topoisomérase II à une concentration de 200 µM (Wada *et al.* 2002). Les acides mariesii A (**51**), B (**52**) et C (**53**), des lanostanes provenant des graines de *A. mariesii*, ont démontré une certaine activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus*, mais l'absence de standards positifs dans ces tests

ne permet pas de juger de l'importance de cet effet (Hasegawa *et al.* 1985; Connolly and R.A.Hill 1991-b).

Un extrait lipophile et l'huile volatile du bois d'*A. sachalinensis* ont démontré une activité antifongique intéressante due à un composé spécifique, la juvabione (54) qui a été isolée et qui est capable d'inhiber la croissance des champignons à une concentration de 300 µg/ml. Ce composé fait partie de la classe des sesquiterpènes et possède un squelette carboné de type bisabolane (Yoneyama *et al.* 1990).

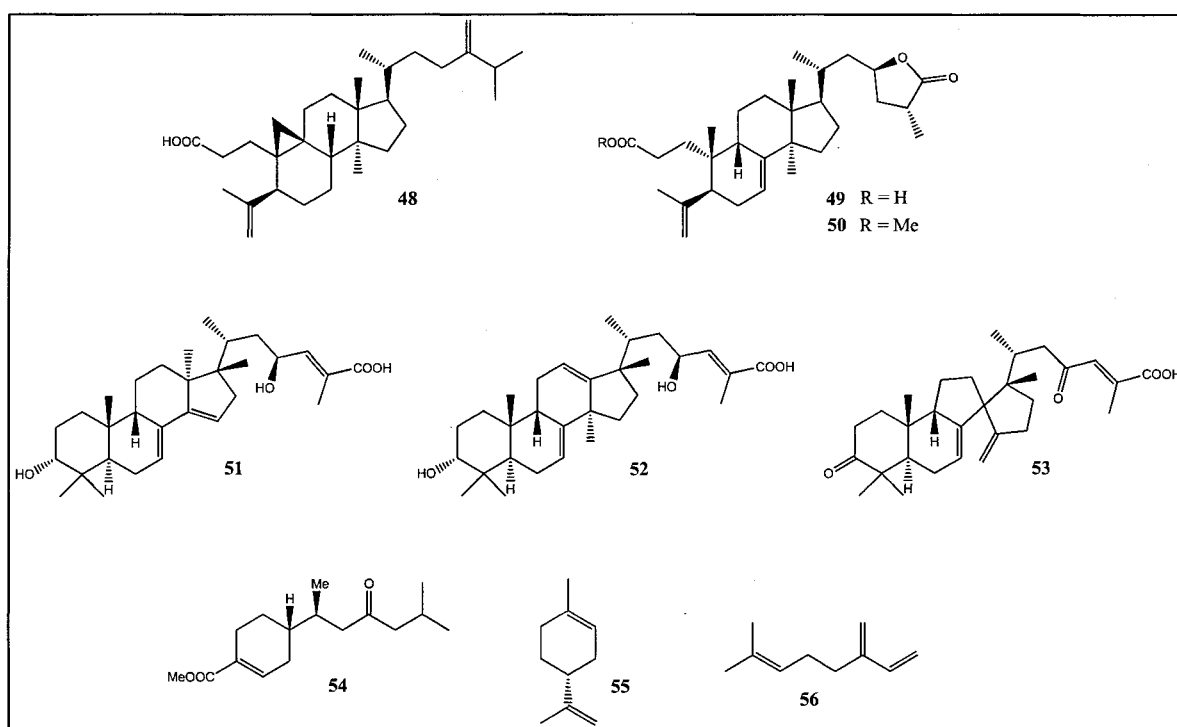


Figure 8 – Molécules isolées du genre *Abies* présentant une activité biologique.

Le (+)-pinitol (**44**) isolé des aiguilles de *A. pindrow* a démontré une action anti-inflammatoire significative sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine (Singh *et al.* 2001). Le limonène (**55**) isolé de l'huile essentielle des cônes d'*A. cilicica* possède quant à lui une action antibactérienne marquée sur onze souches de bactéries différentes dont *Staphylococcus aureus* (3,00 µg/ml) et *Escherichia coli* (2,50 µg/ml). Le myrcène (**56**) isolé lui aussi des cônes possède une action antifongique sur *Kluyveromyces fragilis*, *Rhodotorula rubra* et *Saccharomyces cerevisiae* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de respectivement 1,5; 2,0 et 2,0 µg/ml (Dayisoğlu *et al.* 2009).

2.6 Composition chimique et activités biologiques d'*Abies balsamea*

La juvabione (**54**), isolée du bois de sapin baumier en 1966 (Bowers *et al.* 1966) possède une activité insecticide sur les larves de *Pyrrhocoris apterus*. Par la suite, d'autres molécules semblables à la juvabione (le juvabiol (**57**), l'isojuvabiol (**58**) et la déhydrojuvabione (**59**)) ont été isolées et expliquent aussi l'action insecticide de l'extrait du bois de cette espèce (Manville 1976). Les dérivés de juvabione sont reconnus pour mimer les hormones juvéniles des insectes lorsque ces derniers sont mis en contact avec ces composés, ce qui perturbe leur croissance et leur reproduction (Bohlmann *et al.* 1998).

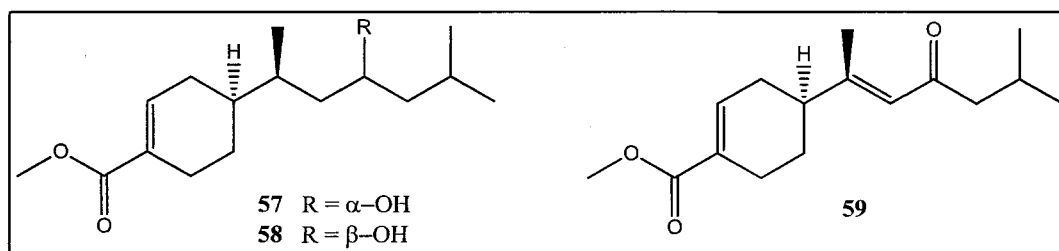


Figure 9 – Juvabiol (57), isjuvabiol (58) et déhydrojuvabione (59).

Depuis la fin des années 1990, le sapin baumier suscite de plus en plus d'intérêt en recherche scientifique et le laboratoire LASEVE de l'UQAC participe activement à l'amélioration des connaissances sur l'étude des propriétés biologiques ainsi que sur la composition chimique de cette plante. La composition de l'huile essentielle extraite des aiguilles du sapin baumier a ainsi été déterminée et les composés identifiés sont compilés dans le tableau 2 (Pichette *et al.* 2006).

Les quatre constituants majeurs de l'huile essentielle sont dans l'ordre le β-pinène, le δ-3-carène, l'α-pinène et l'acétate de bornyle. L'activité antibactérienne de l'huile et de douze de ses composés a été évaluée sur *S. aureus* et *E. coli*. L'huile est active sur *S. aureus* à une CMI de 56 µg/ml et trois composés se démarquent quant à leur action antibactérienne. En effet, l'α-pinène possède une CMI de 13,6 µg/ml sur chacune des deux souches bactérienne tandis que l'α-humulène et le β-caryophyllène ont une CMI sur *S. aureus* de respectivement 2,6 et 5,1 µg/ml.

Tableau 2 - Composition chimique de l'huile essentielle d'*Abies balsamea* selon Pichette *et al.*, 2006.

Composés	Concentration relative (%)
β -Pinène	29,9
δ -3-Carène	19,6
α -Pinène	14,6
Acétate de bornyle	8,4
Limonène	6,6
β -Phellandrène	5,8
Camphène	5,1
Myrcène	1,8
Terpinolène	1,4
Santène	1,1
Tricyclène	0,7
α -Terpinéol	0,7
β -Caryophyllène	0,4
Bornéol	0,2
α -Humulène	0,2

Il a aussi été mis en évidence que le β -caryophyllène, présent entre autre dans l'huile essentielle d'*A. balsamea*, possédait une certaine action potentialisatrice lorsqu'il était administré en même temps que le paclitaxel, augmentant ainsi significativement l'activité anticancéreuse de ce dernier. L'explication suggérée serait que le β -caryophyllène augmenterait temporairement la perméabilité des membranes cellulaires favorisant ainsi l'accumulation du paclitaxel dans les cellules cancéreuses (Legault and Pichette 2007).

Une caractéristique intéressante des conifères est leur capacité à produire de la résine (ou oléorésine). L'oléorésine est en fait un exsudat collant et hydrophobe produit par un conifère souvent en réponse à une infection ou à un dommage physique (Termentzi,

Fokialakis *et al.* 2011). Les résines sont en général composées majoritairement de diterpènes souvent porteurs de fonctions acides carboxyliques, de différents monoterpènes et de divers autres types de métabolites secondaires en quantité moindre (triterpènes, etc.). Ces métabolites secondaires étant produits en réponse à des agressions du milieu pour se défendre contre les organismes pathogènes, cela suggère donc que plusieurs de ces composés pourraient être bioactifs. Plus spécifiquement, la résine des arbres de la famille des *Pinaceae* (dont fait partie le genre *Abies*) est extraite soit de l'écorce (vésicules résinifères) ou soit des cônes femelles. Une fois récoltée, l'oléorésine peut être séparée par distillation en deux parties, soit la fraction volatile qui se nomme *turpentine* et le résidu solide appelé *rosine*. La turpentine est composée de molécules de plus faible poids moléculaires, surtout des monoterpènes et des sesquiterpènes, tandis que la rosine contient plutôt des diterpènes.

Par le passé, l'oléorésine de sapin baumier a fait l'objet de quelques recherches qui ont identifiés certaines molécules d'intérêt. Plusieurs monoterpènes et diterpènes ont été identifiés, mais non isolés de l'oléorésine de sapin baumier récoltée dans l'est et dans l'ouest du Canada. Les structures des composés sont présentées à la figure 10 (Smedman *et al.* 1969). Il est à noter que cette figure ne compte pas les molécules rencontrées à l'état de traces. Pour ce qui est des monoterpènes, l' α -pinène (60), le β -pinène (61), le limonène (55), et le β -phellandrène (62) dominant nettement. Des quantités plus faibles de myrcène (56), de géraniol (63), d'acétate de géranyl (64), de citronellol (65), de bornéol (66), d'acétate de bornyle (10) et de δ -3-carène (67) sont aussi présentes à différents niveaux. Plusieurs de ces monoterpènes sont présents aussi dans l'huile essentielle. Un composé à

neuf atomes de carbone a été isolé de l'oléorésine d'*A. balsamea*; il s'agit du 4,4-diméthyl-2-cycloheptèn-1-one (68) (Balogh *et al.* 1972). Aucune activité biologique n'est répertoriée pour cette molécule.

Concernant les sesquiterpènes, le longifolène (69) et le β -bisabolène (70) se démarquent nettement; ces deux molécules possédant des activités antibactériennes reconnues (Himejima *et al.* 1992; Nascimento *et al.* 2007). Le δ -élémente (71), l' α -humulène (72), le sélina-3,7(11)-diène (73), le β -caryophyllène (74), le γ -cadinène (75), l' α -muurolène (76) et l' α -longipinène (77) sont aussi retrouvés dans la résine, mais dans des quantités moindres.

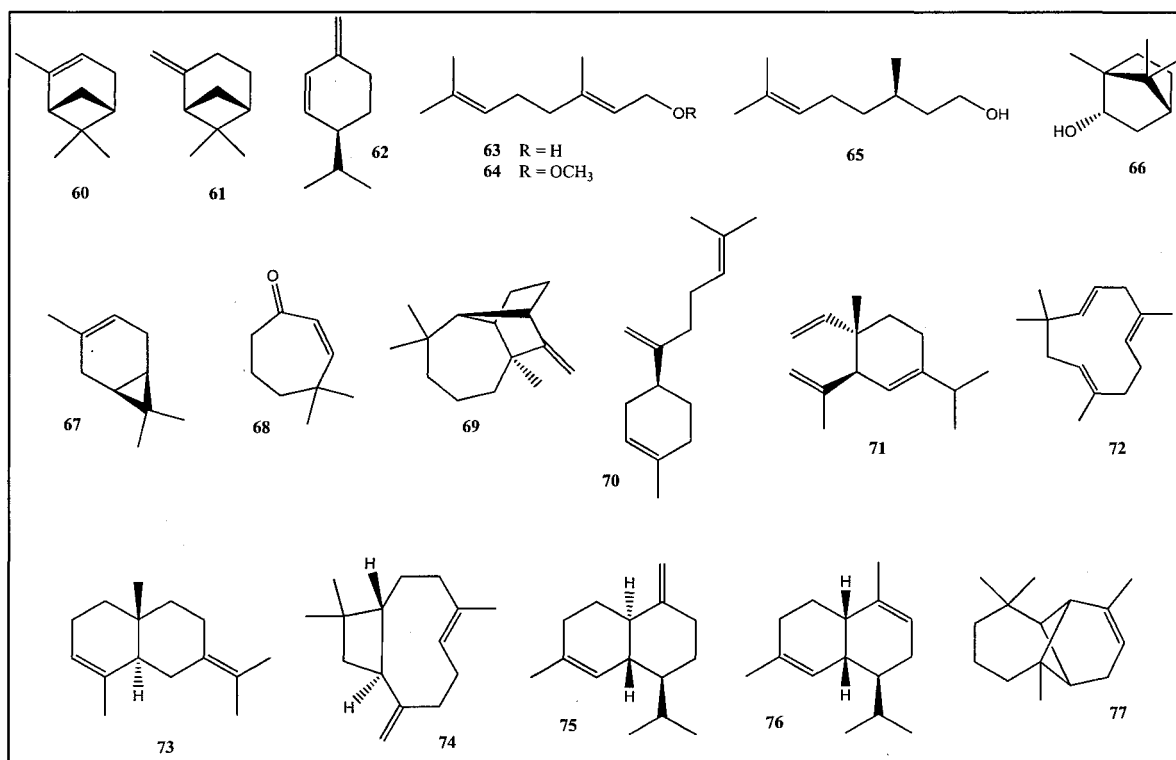


Figure 10 – Mono- et sesquiterpènes identifiés et/ou isolés dans la résine.

Parmi les diterpènes, l'abiéanol (78) isolé de la résine est un léger relaxant musculaire et peut aussi inhiber la synthèse des prostaglandines, molécules participant au phénomène de l'inflammation (Enzell *et al.* 1995). Différents acides résiniques faisant aussi partie de la classe des diterpènes ont été identifiés. Parmi ceux-ci, il est possible de nommer les acides abiétique (79), néoabiétique (80), déhydroabiétique (81), pimarique (82) et isopimarique (83) (Gray and Mills 1964). Ces acides sont reconnus pour posséder des activités biologiques surtout de type antibactérien et antifongique et leurs dérivés peuvent présenter quant à eux des activités antivirales ou anticancéreuses (Feio *et al.* 1999).

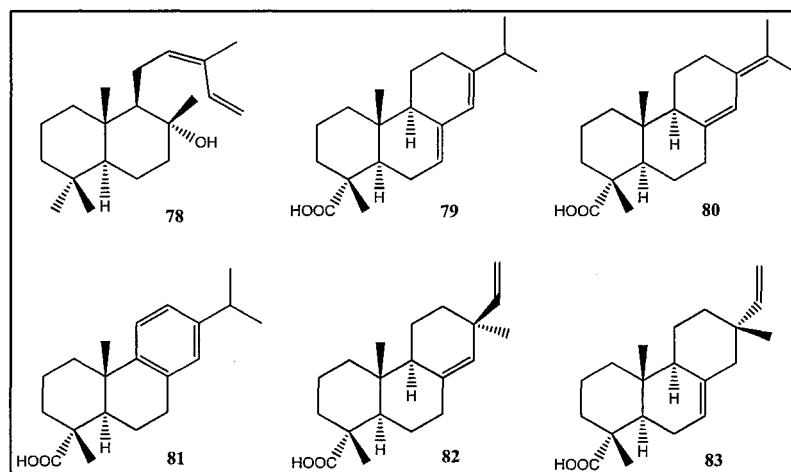


Figure 11 – Principaux acides résiniques isolés de la résine de sapin.

Récemment, deux molécules comportant un squelette tétraterpénique non caroténoïdique ont été isolées, soit l'abibalsamine A (**84**) et B (**85**) (Lavoie *et al.* 2012). Comme mentionné précédemment, ce type de squelette est très rare et la découverte de telles molécules dans la résine de sapin baumier confirme l'intérêt de poursuivre les travaux de recherche sur cette matrice.

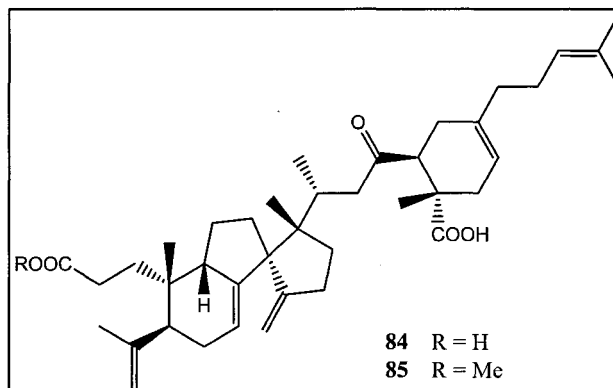


Figure 12 – Tétraterpènes isolés d'*A. balsamea*.

2.7 Utilisations actuelles de la résine et état des connaissances

De nos jours, au Québec, la résine de sapin est toujours mise en marché par quelques compagnies. Par exemple, la résine de la marque de commerce *Sapino* est commercialisée sous forme de gélules pour le soulagement des infections respiratoires et pour application externe sur les blessures (Sapino 2013). D'autres compagnies peuvent commercialiser la résine de sapin à la fois sous forme de capsules, de sirop contre la toux ainsi qu'en plus gros volume pour utilisations diverses (Fortin 2013). Son utilisation pour le collage des lames de microscope dans le domaine biologique tend à diminuer en raison des produits de remplacements synthétiques disponibles sur le marché (Ochei and Kolhatkar 2000; Ebnesajjad 2010). En dépit de sa commercialisation actuelle et de son utilisation ancestrale, la composition chimique de la gomme de sapin est peu connue si l'on exclut l'identification des différents mono- et sesquiterpènes ainsi que des quelques acides résiniques.

Les études ayant porté sur l'isolation de composés des résines du genre *Abies* commencent généralement par une méthylation complète de la résine (Raldugin *et al.* 1986; Raldugin *et al.* 1987; Leibyuk *et al.* 1990). Bien que cette manipulation puisse faciliter l'isolation des molécules, elle peut malheureusement faire perdre des informations importantes sur la structure des composés isolés. En effet, certaines molécules portant deux fonctions acides carboxyliques peuvent être monométhylées naturellement, information qu'il est impossible de déduire après méthylation complète de la résine. C'est pourquoi

l'absence de méthylation sera ici privilégiée et remplacée par une trituration de la résine, ce qui permettra du même coup de conserver « l'authenticité » des molécules présentes.

Les travaux rapportés dans ce mémoire permettront donc de connaître davantage la résine de sapin baumier, tant au niveau chimique qu'au niveau de son activité antibactérienne et cytotoxique et pourront servir de base à la mise en place de nouvelles voies de valorisation pour ce produit.

CHAPITRE 3

ARTICLE SCIENTIFIQUE

LANOSTANE- AND CYCLOARTANE-TYPE TRITERPENOIDS FROM *Abies
balsamea* OLEORESIN

Serge Lavoie, Charles Gauthier, Sylvain Mercier, Jean Legault, Vakhtang Mshvildadze,

André Pichette

(Publié le 4 juillet 2013 dans le *Beilstein Journal of Organic Chemistry*)

Ce chapitre présente l'article scientifique publié le 4 juillet 2013 dans le *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. Cet article regroupe l'essentiel des résultats obtenus lors de cette investigation de la résine de sapin, incluant les résultats des travaux effectués antérieurement à ce projet de maîtrise concernant l'isolation de certains autres di- et triterpènes. Les molécules se retrouvant dans l'article et portant les numéros **4, 5, 9, 12, 13, 14, 16, 17 et 18** ont été isolées dans le cadre de ce mémoire et ne seront donc pas discutées par la suite.



Lanostane- and cycloartane-type triterpenoids from *Abies balsamea* oleoresin

Serge Lavoie^{‡1}, Charles Gauthier^{‡1,2}, Jean Legault¹, Sylvain Mercier¹,
Vakhtang Mshvildadze¹ and André Pichette^{*1}

Full Research Paper

Open Access

Address:

¹Université du Québec à Chicoutimi, Chaire de Recherche sur les Agents Anticancéreux d'Origine Végétale, Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, 555 boul. de l'Université, Chicoutimi (Québec) G7H 2B1, Canada and ²Université de Poitiers, Institut de Chimie IC2MP, UMR-CNRS 7285, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers, France

Email:

André Pichette^{*} - andré_pichette@uqac.ca

^{*} Corresponding author [‡] Equal contributors

Keywords:

Abies balsamea; cycloartane; lanostane; oleoresin; triterpenoids

Beilstein J. Org. Chem. 2013, 9, 1333–1339.
doi:10.3762/bjoc.9.150

Received: 15 April 2013

Accepted: 12 June 2013

Published: 04 July 2013

Associate Editor: A. Kirschning

© 2013 Lavoie et al.; licensee Beilstein-Institut.
License and terms: see end of document.

Abstract

Phytochemical analysis of *A. balsamea* oleoresin led to the isolation of three new 3,4-*seco*-lanostane triterpenoids 1–3, one new cycloartane triterpenoid 4 along with fourteen known terpenoids. Structure determinations were based on extensive 1D/2D NMR, IR and MS spectroscopic analyses, and comparison with literature data. The isolated compounds were evaluated in vitro for their cytotoxicity against human cell lines (A549, DLD-1, WS1) and their antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Abiesonic acid (6) exhibited weak cytotoxic activity against A549 (IC₅₀ = 22 µM) while compounds 1 and 4 were weakly active against *S. aureus* (MIC = 25 µM).

Introduction

The genus *Abies* (Pinaceae) comprises 46 species of evergreen conifers [1]. Most of them are found in temperate and boreal regions of the northern hemisphere. The first phytochemical investigation of *Abies* species was undertaken 75 years ago by Takahashi [2]. Since then, more than 277 secondary metabolites have been isolated, and mainly identified as terpenoids, flavonoids and lignans [3]. Balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill., a popular Christmas tree in Canada, has been used tradi-

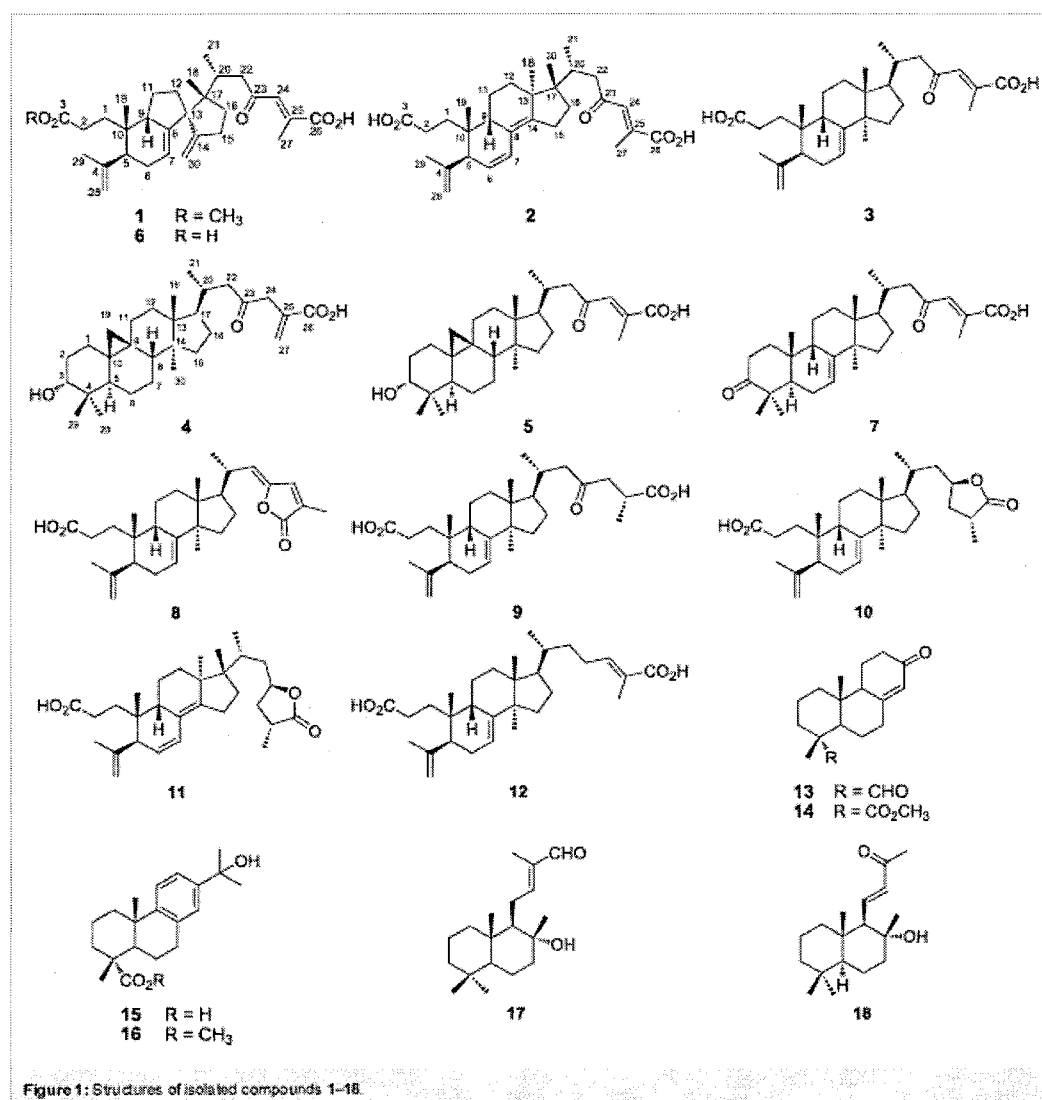
tionally by North American aboriginal people as an antiseptic, tuberculosis remedy, and venereal aid [4]. In recent years, we have become interested in studying the bioactive constituents of *A. balsamea*. Our work allowed the identification of antibacterial sesquiterpenoids, active against *S. aureus*, from balsam fir essential oil [5]. We also isolated two cytotoxic tetraterpenoids from the cortical oleoresin of the tree bark, featuring an unprecedented C₄₀ scaffold [6]. Herein, we describe the further

phytochemical study of *A. balsamea* oleoresin, which led to the isolation and structure elucidation of three 3,4-*seco*-lanostane-type triterpenoids 1–3, one cycloartane-type triterpenoid 4 and fourteen known terpenoids. The antibacterial (*E. coli* and *S. aureus*) and cytotoxic (A549, DLD-1 and WS1) activities of the isolated compounds are also reported.

Results and Discussion

The oleoresin of *A. balsamea* (1st lot) was fractionated by silica gel column chromatography with hexanes/EtOAc (100:0 → 93:7) and MeOH as eluent. Both hexanes/EtOAc 93:7 and

MeOH fractions were combined and concentrated under reduced pressure. Purification of this extract using a combination of silica gel or polyamide column chromatography and reversed phase C₁₈ HPLC resulted in the isolation of three new (1–3) and six known terpenoids (Figure 1). In another experiment, oleoresin (2nd lot) was triturated with hexanes. The precipitate was subjected to successive silica gel column chromatography followed by reversed phase C₁₈ HPLC to give one new (4) as well as three known terpenoids. Similarly, purification of the filtrate afforded five known terpenoids. Based on their spectroscopic data (IR, MS and NMR) and comparison



with literature values, the structures of the known compounds were elucidated as awashishinic acid (**5**) [7], abiesonic acid (**6**) [6], firmanic acid (**7**) [8], (22*Z*)-3,4-*seco*-9β*H*-lanosta-4(28),7,22,24-tetraen-23,26-olid-3-oic acid (**8**) [9], (25*R*)-3,4-*seco*-9β*H*-lanosta-4(28),7-diene-3,26-dioic acid (**9**) [10], abiesolidic acid (**10**) [10,11], (23*R*,25*R*)-3,4-*seco*-17,14-*friedo*-9β*H*-lanosta-4(28),6,8(14)-trien-26,23-olid-3-oic acid (**11**) [10], (24*E*)-3,4-*seco*-9β*H*-lanosta-4(28),7,24-triene-3,26-dioic acid (**12**) [12], abiesanordine C (**13**) [13], methyl 13-oxo-podocarp-8(14)-en-15-oate (**14**) [14], 15-hydroxydehydroabietic acid (**15**) [15], methyl 15-hydroxydehydroabietate (**16**) [16], (12*E*)-8-hydroxy-15-nor-12-labden-14-al (**17**) [17] and 8-hydroxy-14,15-dinor-11-labden-13-one (**18**) [13,18] (Figure 1). ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of known compounds (**5**–**18**) are given in Supporting Information File 1.

Compound **1** was isolated as a white amorphous powder. Its molecular formula was established as C₃₁H₄₄O₅ from the [M + H]⁺ peak at *m/z* 497.3261 (calcd 497.3262) in the positive HRESIMS, indicating ten degrees of unsaturation. The IR spectrum displayed strong absorption bands at 1692 and 1736 cm⁻¹ indicative of carboxylic acid functionalities. The ¹³C NMR and DEPT spectroscopic data (Table 1) exhibited 31 carbons including one carbonyl carbon at δ_C 202.4, and two carboxylic carbons at δ_C 172.4 and 174.8. The ¹H NMR data (Table 2) exhibited six olefinic signals at δ_H 4.73 (s), 4.77 (s), 4.78 (s), 4.86 (s), 5.48 (dd, *J* = 6.2, 3.1 Hz) and 7.11 (br s), one methoxy methyl at δ_H 3.67 (s), four tertiary methyl at δ_H 0.90 (s), 0.92 (s), 1.75 (s) and 2.18 (s) and one secondary methyl at δ_H 0.85 (d, *J* = 6.4 Hz). Detail analysis of the above NMR information, together with ¹H–¹H COSY, HSQC and HMBC analyses indicated that **1** shares the same structure with abiesonic acid (**6**), previously isolated from *A. balsamea* [6], but with an additional methoxy group. An HMBC cross-peak between this methyl signal and the carbon at δ_C 174.8 (C-3) allowed the assignment of compound **1** as (–)-*re*-*l*-abiesonic acid 3-methyl ester.

Compound **2**, obtained as a white amorphous powder, possessed a molecular formula of C₃₀H₄₂O₄ with ten degrees of unsaturation based on the [M + H]⁺ peak at *m/z* 483.3087 (calcd 483.3105) in the positive HRESIMS. The IR absorption bands showed the presence of carboxylic acid (1702 cm⁻¹) and olefin (1635 cm⁻¹) functionalities. The ¹³C NMR spectroscopic data of **2** (Table 1) displayed 30 carbon signals, which by the assistance of a DEPT experiment, were identified as six methyl, seven *sp*³ methylene and three *sp*³ methine groups, three *sp*³ quaternary carbon atoms, one *sp*² methylene and three *sp*² methine groups, and seven *sp*² quaternary carbon atoms. A ¹H–¹H COSY experiment provided correlations from H₂-1 to H₂-2, H-6 to H-5 and H-7, H₂-11 to H-9 and H₂-12, H₂-15 to

Table 1: ¹³C NMR spectroscopic data (100 MHz, CDCl₃) of compounds 1–4.

Position	1	2	3	4
1	30.5	28.3	28.8	27.5
2	29.2	29.8	29.2	28.5
3	174.8	181.6	180.8	77.1
4	149.2	145.6	149.7	39.5
5	44.0	50.6	45.3	41.1
6	30.9	127.0	29.7	21.1
7	122.4	125.2	118.0	25.6
8	143.4	125.4	146.3	48.0
9	49.5	39.4	38.6	19.7
10	36.9	37.0	36.3	26.5
11	22.5	19.6	18.5	26.2
12	31.2	32.0	33.8	32.8
13	63.5	47.4	43.8	45.4
14	160.9	146.2	51.7	49.0
15	27.8	23.9	34.0	35.4
16	36.1	36.3	28.5	28.3
17	50.2	49.1	53.1	52.2
18	17.7	21.9	21.7	18.1
19	24.7	21.8	24.1	29.8
20	33.8	35.1	33.3	32.9
21	16.4	15.9	19.5	19.3
22	48.3	48.9	51.9	50.0
23	202.4	202.5	202.4	207.6
24	134.9	133.0	134.4	46.1
25	138.7	140.4	139.3	133.9
26	172.4	173.4	172.8	170.8
27	14.0	14.0	13.9	130.5
28	111.9	115.6	112.0	25.8
29	26.1	24.8	26.0	21.2
30	106.9	15.8	27.5	19.3
OMe	51.7	–	–	–

H₂-16 and H-20 to H₃-21 and H₂-22 (Figure 2). Analysis of HMBC spectra indicated correlations from H₃-19 to C-1, C-5, C-9 and C-10; from H₃-29 to C-4, C-5 and C-28; from H-7 to C-8; from H₃-18 to C-12, C-13, C-14 and C-17; from H₃-30 to C-13, C-16, C-17 and C-20; from H₃-21 to C-17, C-20 and C-22; from H₂-22 and H-24 to C-23; and from H₃-27 to C-24, C-25 and C-26. The relative configuration of **2** was determined by analysis of a NOESY experiment, which provided correlations (Figure 2) of H-5 to H₂-2; H-28*Z* to H-9; H-22*a* (δ_H 2.85) to H₃-18 and H₃-21; H₃-18 to H-22*b* (δ_H 2.16) and H-24; H-24 to H-20 and H-22*b*. These correlations indicated the α-orientation of H-5 and H₃-30 and the β-orientation of H-9, H₃-18 and H₃-19. All these facts suggested that compound **2** was strongly similar to *cis*-sibiric acid [19]. Since the chemical shift of H-24 in *cis*-sibiric acid (δ_H 6.15) was upfield of the signal for **1** (δ_H 7.11), **2** (δ_H 7.23), **6** (δ_H 7.13) and **7** (δ_H 7.07), this suggested

Table 2: ^1H NMR spectroscopic data (400 MHz, CDCl_3) of compounds 1–4.

Position	δ_{H} (J in Hz)			
	1	2	3	4
1	1.74, m, 1.62, m	1.60, m	1.73, m, 1.60, m	1.85, m, 1.01, m
2	2.30, m	2.31, m	2.32, m	1.93, m, 1.64, m
3	—	—	—	3.48, t (2.4)
5	2.08, m	2.63, d (5.4)	2.08, m	1.82, m
6	2.40, m, 2.13, m	5.39, dd (9.9, 5.5)	2.27, m, 1.99, m	1.48, m, 0.77, m
7	5.48, dd (6.2, 3.1)	6.22, d (10.0)	5.33, br s	1.30, m, 1.11, m
8	—	—	—	1.54, m
9	2.06, m	2.43, m	2.59, m	—
11	1.59, m, 1.40, m	1.62, m	1.60, m	2.00, m, 1.13, m
12	1.77, m, 1.32, m	1.65, m	1.83, m, 1.67, m	1.62, m
15	2.48, m, 2.37, m	2.41, m, 2.32, m	1.52, m	1.31, m
16	1.55, m	1.73, m, 1.54, m	1.92, m, 1.26, m	1.87, m, 1.27, m
17	—	—	1.54, m	1.61, m
18	0.90, s	1.16, s	0.80, s	1.00, s
19	0.92, s	0.87, s	0.86, s	0.52, d (3.9), 0.35, d (3.9)
20	2.39, m	2.24, m	2.03, m	2.02, m
21	0.85, d (6.4)	0.80, d (6.5)	0.91, d (6.2)	0.88, d (6.8)
22	2.49, m, 2.25, m	2.85, m, 2.16, br d (12.3)	2.64, m, 2.32, m	2.56, dd (16.0, 2.1), 2.24, dd (16.1, 10.2)
24	7.11, br s	7.23, br s	7.15, s	3.42, d (17.0), 3.36, d (17.1)
27	2.18, s	2.22, d (1.0)	2.21, s	6.45, br s, 5.73, br s
28	4.86, s, 4.78, s	4.98, br s, 4.76, d (2.4)	4.88, s, 4.82, s	0.95, s
29	1.75, s	1.79, s	1.80, s	0.88, s
30	4.77, s, 4.73, s	0.69, s	1.04, s	0.90, s
OMe	3.67, s	—	—	—

that the *trans*-stereoisomer was isolated instead of the *cis*-one (See Table 2 and Supporting Information File 1). This was further confirmed by NOESY correlation of H-24 to H-20 and H₃-30, but not to H₃-27. Consequently, the structure of **2** was determined as (–)-*rel*-(24*E*)-23-oxo-3,4-*seco*-9 β *H*-lanosta-4(28),6,8(14),24-tetraen-3,26-dioic acid.

Compound **3**, a white amorphous powder, possessed a molecular formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$ based on the $[\text{M} + \text{H}]^+$ peak at m/z 485.3250 (calcd 485.3262) in the positive HRESIMS, suggesting nine degrees of unsaturation. The IR spectrum implied the existence of carboxylic acid (1703 cm^{-1}) and olefin (1633 cm^{-1}) functionalities. The ^{13}C NMR spectroscopic data of **3** resembled those of (24*E*)-3,4-*seco*-9 β *H*-lanosta-4(28),7,24-triene-3,26-dioic acid (**12**) [12] except for change at δ_{C} 33.3 (C-20), 19.5 (C-21), 51.9 (C-22), 202.4 (C-23), 134.4 (C-24), 139.3 (C-25), 172.8 (C-26) and 13.9 (C-27) (See Table 1 and Supporting Information File 1). The HMBC correlations from H-24 to C-23 indicated the presence of a ketone group at C-23 (Figure 2). This conclusion was confirmed from the downfield δ_{C} of C-22 (+16.4) in comparison with **12**. The relative configuration was established with the NOESY spectrum

(Figure 2). Briefly, the configuration at C-5, C-9, C-10, C-13 and C-17 was determined by cross-peaks from H-28Z to H-9; H-5 to H₃-19 and H₃-29; H₃-18 to H-9 and H-20; H₃-30 to H-17; and H₃-21 to H₂-12. NOESY correlation between H-24 and H₃-27 was not observed, suggesting that the geometry of the C-24,25 double bond was *E*. This was confirmed by δ_{H} comparison of H-24 with that of **1**, **2**, **6** and **7** (See Table 2 and Supporting Information File 1). On the basis of these spectroscopic evidences, the structure of **3** was assigned as (–)-*rel*-(24*E*)-23-oxo-3,4-*seco*-9 β *H*-lanosta-4(28),7,24-triene-3,26-dioic acid.

The HRESIMS of **4**, isolated as a white amorphous powder, showed a pseudomolecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion peak at m/z 471.3463, corresponding to the formula $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ (calcd. 471.3469), indicating eight degrees of unsaturation. The IR absorption bands at 3416 , 1708 and 1633 cm^{-1} suggested the presence of hydroxyl, carbonyl and olefin functionalities. The ^{13}C NMR and DEPT-135 spectra of **4** showed signals for 30 carbons designated as five methyl; twelve methylene, including one alkene at δ_{C} 130.5; five methine, including one secondary alcohol at δ_{C} 77.1; and eight quaternary carbons, including those at δ_{C} 170.8 and

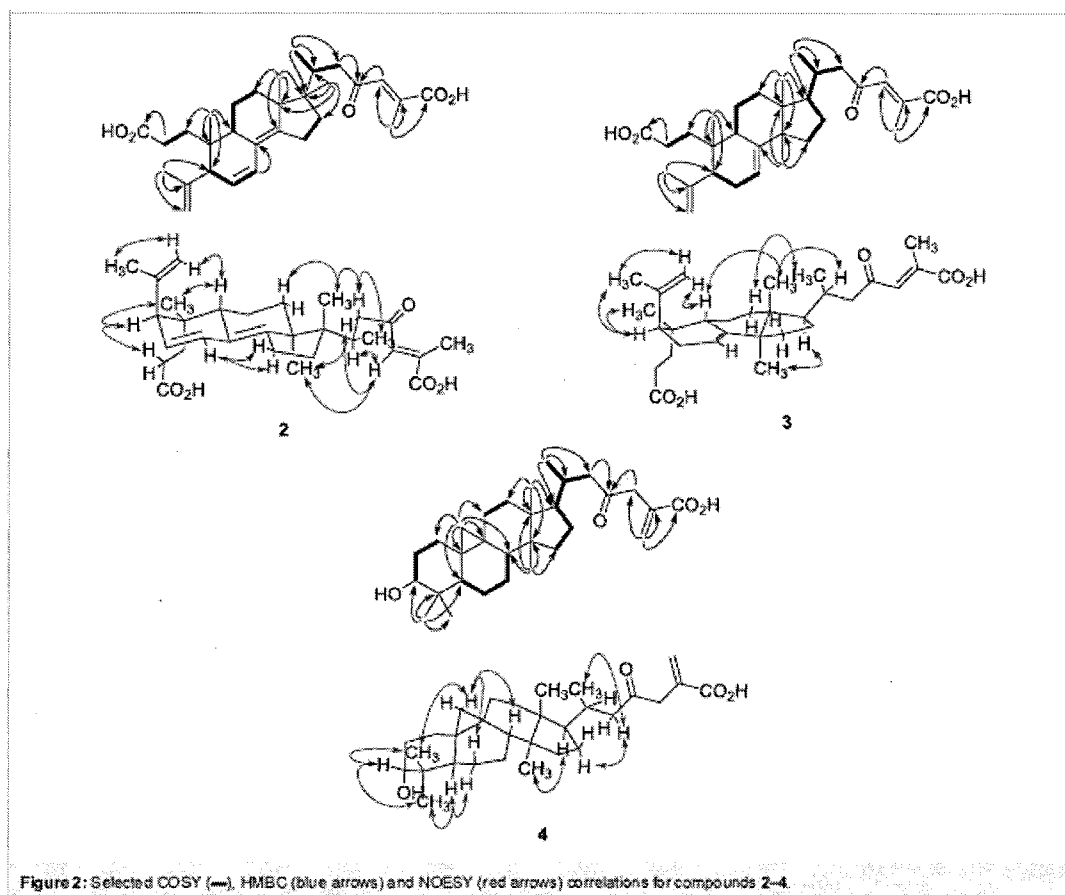


Figure 2: Selected COSY (—), HMBC (blue arrows) and NOESY (red arrows) correlations for compounds 2–4.

207.6 representing carboxylic and ketone carbonyls, respectively (Table 1). The ^1H NMR spectrum showed two doublets at δ_{H} 0.35 ($J = 3.9$ Hz) and 0.52 ($J = 3.9$ Hz) characteristic of a cyclopropane ring (Table 2), suggesting that **4** is a member of the cycloartanes, which is an important triterpenic family in the genus *Abies* [3]. In the ^1H – ^1H COSY spectrum, correlations between H_2 -2 to H_2 -1 and H -3; H_2 -6 to H -5 and H_2 -7; H_2 -7 to H -8; H_2 -16 to H_2 -15 and H -17; and H -20 to H_3 -21 and H_2 -22 were observed (Figure 2). HMBC correlations from H_2 -19 to C-1, C-5, C-8, C-9, C-10 and C-11 connected together three different fragments in the vicinity of the cyclopropyl group. Other correlations between H_3 -18 to C-12, C-13, C-14 and C-17; H_3 -21 to C-17, C-20 and C-22; H_2 -27 to C-24, C-25 and C-26; H_3 -28 and H_3 -29 to C-3, C-4, C-5, C-28 and C-29; H_3 -30 to C-8, C-13, C-14 and C-15; and H_2 -22 and H_2 -24 to C-23 were observed and completely assigned the carbon skeleton of the molecule (Figure 2). The relative configuration was determined with the help of a 2D NOESY experiment showing correlations from H -19 β to H -6 β , H -8 and H_3 -29; H -5 to H_3 -28

and H -6 α ; H_3 -30 to H -11 α and H -17; and H -22 β to H -20 and H_2 -16 (Figure 2). The α -orientation of the hydroxy group at C-3 was deduced from the small coupling constant of H -3 ($J = 2.4$ Hz), and from the NOESY correlations with both H_3 -28 and H_3 -29. Accordingly, the structure of compound **4** was defined as (+)-*rel*-3 α -hydroxy-23-oxocycloart-25(27)-en-26-oic acid.

The absolute stereochemistry of the new compounds (**1**–**4**) has not been determined experimentally. However, the previously described compounds **7**, **9**, **10** and **11** have been shown to possess the usual configuration for triterpenes [8,10,11]. The structures of many other triterpenes isolated from the genus *Abies* were also reported with this absolute configuration according to their X-ray crystallographic data [20–22].

The structure of compound **8** was reported by Xia et al [9]. In their paper, the configuration at Δ^{22} was determined as *E* but it was not supported by any spectroscopic data. Since ^1H and

^{13}C NMR data obtained for **8** were identical to those reported by Xia within 0.01 and 0.1 ppm respectively (see Supporting Information File 1), we supposed that both molecules were the same. However, the geometry at Δ^{22} should be assigned to Z because of the clear NOESY correlation between H-22 and H-24. Interestingly, lanostane with E geometry at Δ^{22} has never been isolated so far. Moreover, triterpenes with this kind of side chain bearing an E configuration for Δ^{22} have only been reported by Guo et al [23,24]. During their work on *Schisandra* spp., they isolated many nortriterpenes having both Δ^{22} configurations. A statistical analysis of the ^1H chemical shift for H-22 and H-24 was conducted: for E-configured Δ^{22} , δ_{H} are 5.9 ± 0.2 and 7.8 ± 0.1 while for Z-configured Δ^{22} , δ_{H} are 5.3 ± 0.1 and 7.2 ± 0.2 , respectively. Since δ_{H} measured for compound **8** was 4.98 and 6.97, it should be assigned as (22Z)-3,4-seco-9 β H-lanosta-4(28),7,22,24-tetraen-23,26-olid-3-oic acid.

The isolates were evaluated in vitro for their cytotoxic activities against two human cancer cell lines, namely lung carcinoma (A549) and colon adenocarcinoma (DLD-1), as well as against one healthy cell line (WS1) using the resazurin reduction test [25]. Etoposide was used as a positive control ($\text{IC}_{50} \leq 1.0 \mu\text{M}$). None of the compounds were found to be active ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$) with the exception of abiesonic acid (**6**), which showed a weak cytotoxic activity against A549 ($\text{IC}_{50} = 22 \mu\text{M}$). The antibacterial activity of isolated compounds was also evaluated in vitro against *E. coli* and *S. aureus* using the microdilution assay [26] with gentamycin as a positive control ($\text{MIC} < 0.1 \mu\text{g/mL}$). No activity was observed for all the tested compounds ($\text{MIC} \geq 50 \mu\text{M}$) except for triterpenoids **1** and **4**, which were weakly active against *S. aureus* ($\text{MIC} = 25 \mu\text{M}$).

Supporting Information

Supporting Information File 1

Experimental procedures, product characterization and ^1H and ^{13}C spectra for compounds 1–18.

[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-9-150-S1.pdf>]

Acknowledgements

We acknowledge "Chaire de Recherche sur les Agents Anticancéreux d'Origine Végétale" and NSERC for funding, and Catherine Dussault for biological assessment. The photograph from our graphical abstract is from Robert H. Mohlenbrock @ USDA-NRCS PLANTS Database / USDA NRCS. 1995. Northeast wetland flora: Field office guide to plant species. Northeast National Technical Center, Chester.

References

- Mabberley, D. J. *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2008; pp 1 ff.
- Takahashi, T. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 1938, 58, 888–901.
- Yang, X.-W.; Li, S.-M.; Shen, Y.-H.; Zhang, W.-D. *Chem. Biodiversity* 2008, 5, 56–61. doi:10.1002/cbdv.200890015
- Herrick, J. W.; Snow, D. R. *Iroquois medical botany*; Syracuse University Press: Syracuse, NY, 1995; p 278.
- Pichette, A.; Larouche, P.-L.; Lebrun, M.; Legault, J. *Phytother. Res.* 2006, 20, 371–373. doi:10.1002/ptr.1893
- Lavoie, S.; Legault, J.; Gauthier, C.; Mshvildadze, V.; Mercier, S.; Pichette, A. *Org. Lett.* 2012, 14, 1504–1507. doi:10.1021/ol300237f
- Shang, N.; Guerrero-Analco, J. A.; Musallam, L.; Saleem, A.; Muhammad, A.; Walshe-Roussel, B.; Cuernier, A.; Arason, J. T.; Haddad, P. S. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 141, 1051–1057. doi:10.1016/j.jep.2012.04.002
- Roshchin, V. I.; Raldugin, V. A.; Baranova, R. A.; Pentegova, V. A. *Chem. Nat. Compd.* 1986, 22, 613–614. doi:10.1007/BF00598284
- Xia, J.-H.; Zhang, S.-D.; Li, Y.-L.; Wu, L.; Zhu, Z.-J.; Yang, X.-W.; Zeng, H.-W.; Li, H.-L.; Wang, N.; Steinmetz, A.; Zhang, W.-D. *Phytochemistry* 2012, 74, 178–184. doi:10.1016/j.phytochem.2011.11.011
- Wada, S.-I.; Iida, A.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1657–1659. doi:10.1021/np020282b
- Raldugin, V. A.; Gatilov, Y. V.; Rybalova, T. V.; Rashkes, Y. V. *Chem. Nat. Compd.* 1986, 22, 645–651. doi:10.1007/BF00598342
- Kim, H. J.; Choi, E. H.; Lee, I.-S. *Phytochemistry* 2004, 65, 2545–2549. doi:10.1016/j.phytochem.2004.07.007
- Yang, X.-W.; Li, S.-M.; Feng, L.; Shen, Y.-H.; Tian, J.-M.; Liu, X.-H.; Zeng, H.-W.; Zhang, C.; Zhang, W.-D. *Tetrahedron* 2008, 64, 4354–4362. doi:10.1016/j.tet.2008.02.069
- Abad, A.; Arnó, M.; Peiró, M.; Zaragoza, R. J. *Tetrahedron* 1991, 47, 3829–3844. doi:10.1016/S0040-4020(01)80907-8
- Zhao, Y.-X.; Zhou, L.; Guo, L.; Luo, X.-D.; Zhou, J. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2005, 7, 259–264. doi:10.1080/10286020410001690163
- Alvarez-Manzaneda, E. J.; Chahboun, R.; Guardia, J. J.; Lachkar, M.; Dahdouh, A.; Lara, A.; Messouri, I. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 2577–2580. doi:10.1016/j.tetlet.2006.02.037
- Wahlberg, I.; Vogt, C.; Wallin, I.; Nishida, T.; Enzell, C. R. *Acta Chem. Scand., Ser. B* 1982, 36, 573–578. doi:10.3891/acta.chem.scand.36b-0573
- Wahlberg, I.; Karlsson, K.; Curvall, M.; Nishida, T.; Enzell, C. R. *Acta Chem. Scand., Ser. B* 1978, 32, 205–215. doi:10.3891/acta.chem.scand.32b-0203
- Shevtsov, S. A.; Raldugin, V. A. *Chem. Nat. Compd.* 1989, 25, 182–187. doi:10.1007/BF00598407
- Li, Y.-L.; Gao, Y.-X.; Yang, X.-W.; Jin, H.-Z.; Ye, J.; Simmons, L.; Wang, N.; Steinmetz, A.; Zhang, W.-D. *Phytochemistry* 2012, 81, 159–164. doi:10.1016/j.phytochem.2012.05.032
- Yang, X.-W.; Li, S.-M.; Wu, L.; Li, Y.-L.; Feng, L.; Shen, Y.-H.; Tian, J.-M.; Tang, J.; Wang, N.; Liu, Y.; Zhang, W.-D. *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 2609–2616. doi:10.1039/c001885f
- Li, Y.-L.; Yang, X.-W.; Li, S.-M.; Shen, Y.-H.; Zeng, H.-W.; Liu, X.-H.; Tang, J.; Zhang, W.-D. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1065–1068. doi:10.1021/np900790h
- Wang, J.-R.; Kurtán, T.; Mándi, A.; Guo, Y.-W. *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 5471–5482. doi:10.1002/ejoc.201200557

24. He, F.; Li, X.-Y.; Yang, G.-Y.; Li, X.-N.; Luo, X.; Zou, J.; Li, Y.; Xiao, W.-L.; Sun, H.-D. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 440–446. doi:10.1016/j.tet.2011.11.026
25. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2009**, *287*, 5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
26. Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin, C. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 796–800. doi:10.1093/jac/dkg439

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:
[doi:10.3762/bjoc.9.150](https://doi.org/10.3762/bjoc.9.150)

CHAPITRE 4

AVANCEMENT DES TRAVAUX

Ce chapitre est consacré aux travaux effectués au cours de ce projet mais qui ne font pas partie de l'article scientifique présenté au chapitre 3. En effet, deux molécules rapportées pour la première fois ont été isolées de la résine (l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque et le 3 β -hydroxy-abiénol). De plus, bien que l'isolation de l'acide abiesonique et de l'acide firmanoïque (deux molécules connues) soit déjà présentée dans l'article, leur purification est quand même détaillée dans ce chapitre. Ce choix s'explique par le fait que le schéma d'isolation emprunté dans ce mémoire diffère de celui suivi lors de leur précédente isolation par notre groupe de recherche. Cette section décrit aussi la caractérisation et les résultats biologiques qui sont rattachés à ces composés.

4.1 Choix du solvant pour la trituration de la résine

La résine a été d'abord précipitée dans un solvant afin de recueillir les composés les plus polaires sous forme de poudre. Cette technique se nomme *trituration* et elle est employée dans plusieurs domaines, particulièrement en chimie de synthèse (Cotarca and Eckert 2006; Hughes 2011). La trituration consiste donc à mélanger une substance, soit liquide et visqueuse soit solide, avec un solvant dans lequel les molécules d'intérêt ne sont pas solubles et dans lequel les impuretés sont solubilisées, ou vice-versa. Il s'en suit donc une précipitation qui permet, après filtration et évaporation du solvant, de séparer le produit brut en deux fractions distinctes. Trois solvants ont été testés pour la trituration de la résine (figure 13), soit l'hexane, l'eau et un mélange méthanol/eau 1:100 (le méthanol 100% n'a pas été testé car la résine y était trop soluble). L'hexane a été choisi en raison de son

efficacité évaluée par chromatographie sur couche mince (CCM), les deux autres solvants n'ayant pas permis d'observer une séparation intéressante. À la suite de la trituration, le précipité a été obtenu dans un rendement de 3%.

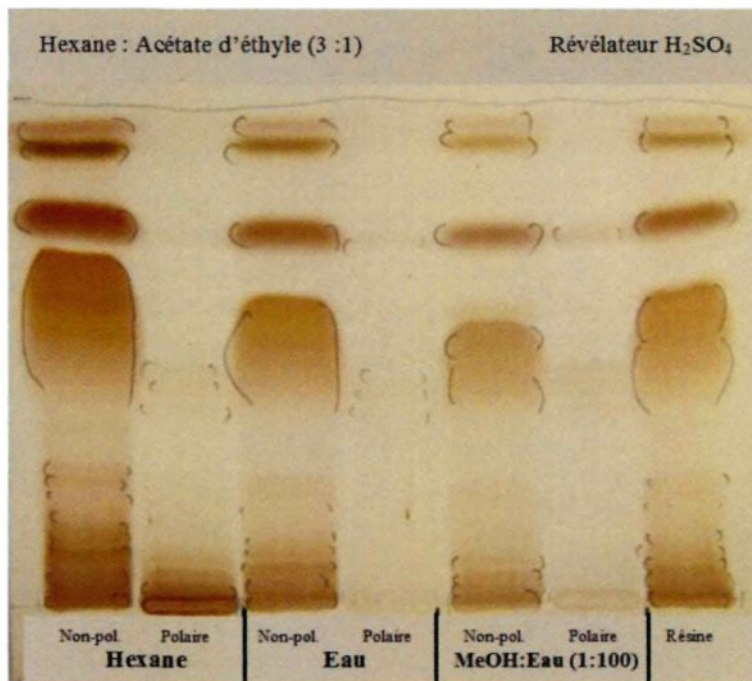


Figure 13 – CCM des tests de trituration de la résine.

Dans le cas présent, la résine a été mélangée avec de l'hexane (ratio : 40 g de résine / litre d'hexane), agitée et le mélange a été refroidi dans un bain de glace pendant 30 minutes pour favoriser la précipitation de la partie polaire. Ensuite, le tout a été filtré sur filtre Whatman #4 pour recueillir une poudre blanc-jaunâtre et le filtrat a été évaporé pour obtenir la fraction non polaire de la résine. La séparation a été confirmée par CCM de l'extrait brut et des deux fractions obtenues.

4.2 Schéma d'isolation initial

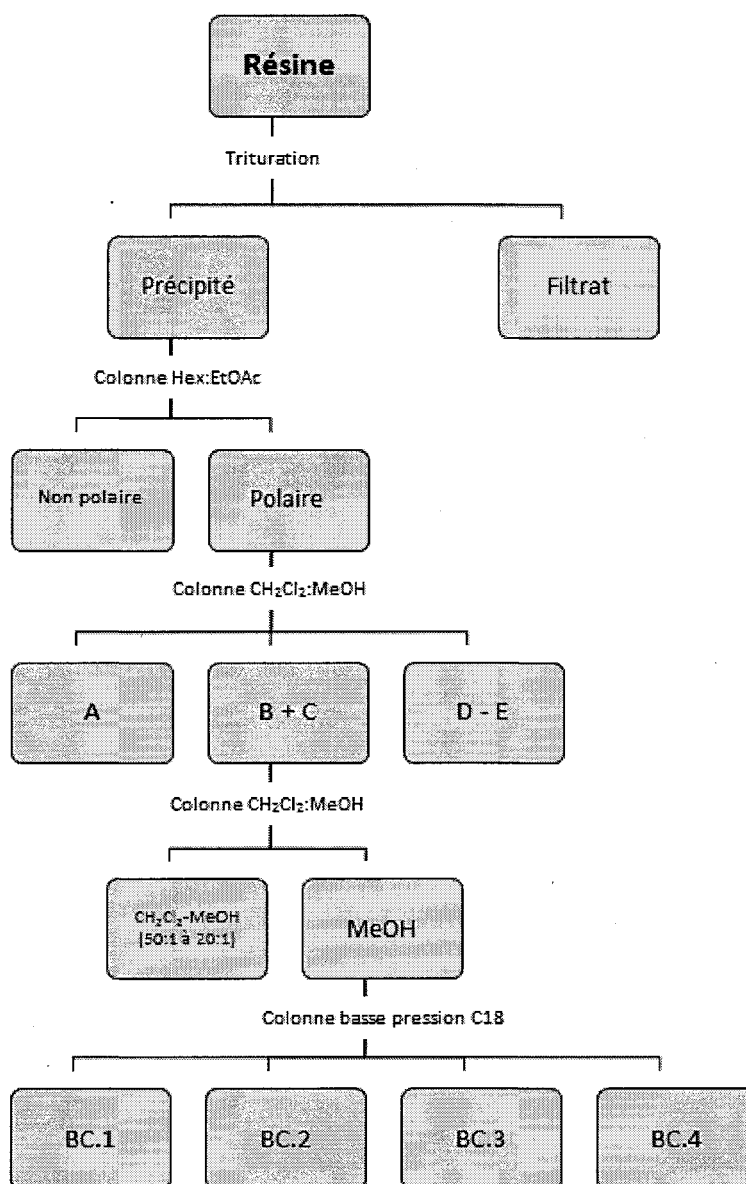


Figure 14 – Fractionnement du précipité provenant de la trituration de la résine.

L'oléorésine provenant de l'entreprise « Les gommes de sapin du Québec inc. » (1361 g) a été triturée dans l'hexane froid selon la procédure présentée à la section 4.1. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite pour donner une huile jaune (1284 g). Pour récupérer les composés non polaires résiduels dans le précipité (45,7 g), ce dernier a été fractionné sur colonne de gel de silice avec une solution de CH_2Cl_2 -MeOH (4:1) et la colonne a été finalement lavée au méthanol afin de recueillir la partie polaire (figure 14).

Après évaporation du solvant, la fraction méthanolique a été séparée sur gel de silice en utilisant un éluant CH_2Cl_2 -MeOH en gradient (25:1 \rightarrow 15:1). L'élution a été terminée au méthanol permettant ainsi d'obtenir cinq fractions (A à E). Les fractions B (2,4 g) et C (8,6 g) ont été réunies ensemble sur la base de la similitude de leur composition chimique et le mélange a été purifié sur colonne de silice avec CH_2Cl_2 -MeOH (50:1 \rightarrow 30:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow MeOH). La fraction méthanolique (5,9 g) a été purifiée par LPLC sur colonne de silice RP18 en utilisant un gradient de 70% à 100% MeOH dans l'eau. Cette dernière séparation a permis d'obtenir quatre sous-fractions nommées BC.1 à BC.4.

La figure 15 illustre les structures chimiques des quatre molécules isolées des fractions BC.1, BC.2 et du filtrat (voir figure 18 pour le schéma de fractionnement du filtrat hexane).

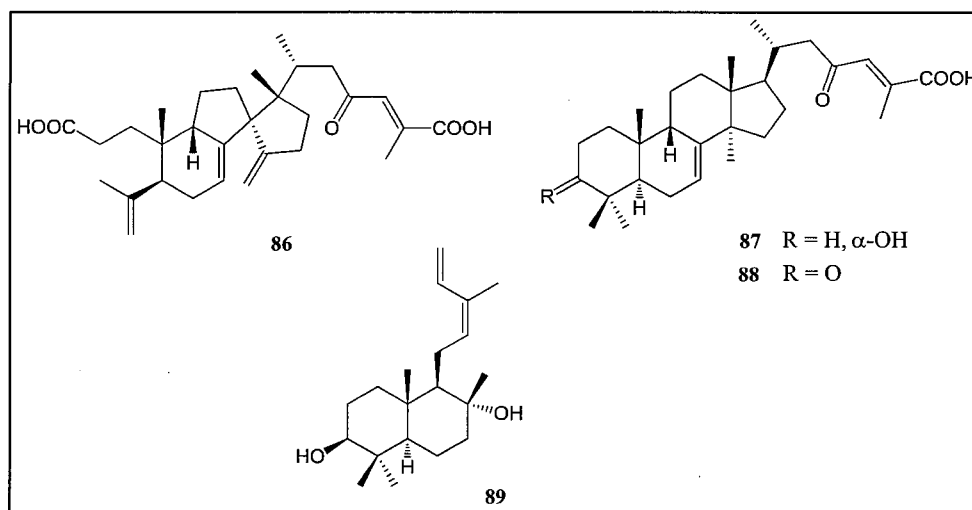


Figure 15 – Molécules supplémentaires isolées de la résine de sapin baumier.

4.3 Isolation de l'acide abiesonique (86)

La fraction BC.1 (1,3 g, figure 16) a été séparée sur colonne de silice en utilisant comme système d'éluant CH_2Cl_2 -MeOH (20 :1 \rightarrow 15 :1 \rightarrow MeOH) pour en arriver à six nouvelles fractions (BC.1.1 à BC.1.6). La fraction BC.1.6 (374 mg) a été purifiée par HPLC préparatif en utilisant le système isocratique 70% acétonitrile dans l'eau (+ 0.1% HCOOH) pour obtenir l'acide abiesonique (63,4 mg) sous forme de poudre blanche amorphe. L'identification par RMN de cette molécule a été réalisée en comparant les spectres obtenus avec ceux de la molécule identique déjà isolée et caractérisée par le laboratoire LASEVE ainsi qu'avec ceux retrouvés dans la littérature (Raldugin, Gatilov *et al.* 1986).

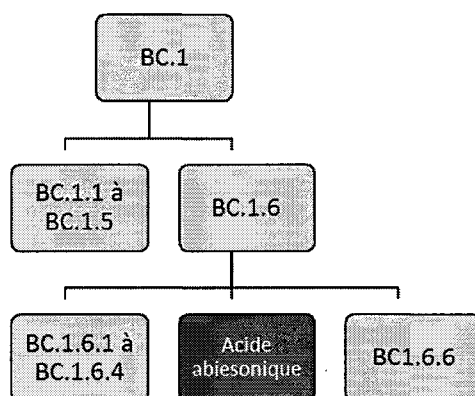


Figure 16 – Schéma de fractionnement de la fraction BC.1.

4.4 Isolation de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (**87**) et de l'acide firmanoïque (**88**)

Tel que montré à la figure 17, la fraction BC.2 (578 mg) a été fractionnée par HPLC préparatif en utilisant un gradient 90% \rightarrow 100% méthanol dans l'eau (+ 0.1% HCOOH) et cette étape a mené à quatre fractions (BC.2.1 à BC.2.4). La fraction BC.2.3 (149 mg) a été purifiée par HPLC préparatif avec un gradient 88% \rightarrow 93% méthanol dans l'eau (+ 0.1% HCOOH) permettant d'obtenir l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (**87**, 7,0 mg) et l'acide firmanoïque (**88**, 15,8 mg) tous deux sous forme de poudre amorphe blanche. Les données RMN de la molécule **87** se trouvent dans le tableau 3 et les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont présentés en annexes 1 et 2. La détermination de la structure de l'acide firmanoïque a été effectuée en comparant les données RMN du produit isolé avec des résultats préalablement obtenus au laboratoire et également en comparant avec des données rapportées dans la littérature (Roshchin *et al.* 1986)

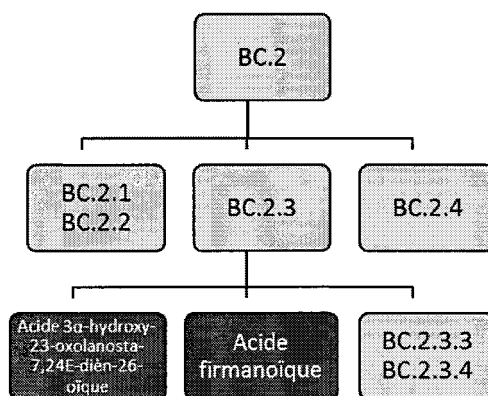


Figure 17 – Schéma de fractionnement de la fraction BC.2.

L'identification RMN du composé **87** a été réalisée en comparant les spectres obtenus à ceux de l'acide firmanoïque. Les squelettes carbonés des deux composés sont identiques, à l'exception de la présence d'un pic à δ_C 77,0 qui représente l'alcool secondaire présent sur le C-3. L'orientation spatiale de ce groupement a été établie par une analyse NOESY qui démontre que le singulet large à δ_H 3,36 (qui représente l'hydrogène en C-3) corrèle également avec H₃-28 et H₃-29, ce qui ne peut s'expliquer que si l'alcool est en position alpha.

L'acide firmanoïque a déjà été isolé dans le genre *Abies* (Hasegawa *et al.* 1987). Par contre, pour ce qui est du composé **87**, il s'agit d'une nouvelle molécule jamais rapportée auparavant dans la littérature.

Tableau 3 – Données RMN de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (87) et du 3 β -hydroxy-abiéanol (89).

Position	Acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (87) ^b		3 β -hydroxy-abiéanol (89) ^a	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	1,29 (1H, m), 1,90 (1H, m)	31,12	1,09 (1H, m), 1,70 (1H, m)	38,26
2	1,56 (1H, m), 1,97 (1H, m)	26,84	1,58 (1H, m), 1,65 (1H, m)	27,22
3	3,36 (1H, br s)	77,04	3,23 (1H, dd, J = 11,3, 4,6 Hz)	78,65
4		38,41		38,84
5	1,30 (1H, m)	43,79	0,93 (1H, dd, J = 11,7, 1,8 Hz)	55,02
6	1,89 (2H, m)	24,20	1,32 (1H, m), 1,67 (1H, m)	19,93
7	5,58 (1H, m)	122,97	1,44 (1H, m), 1,87 (1H, dt, J = 11,9, 2,8 Hz)	43,84
8		150,00		74,04
9	2,30 (1H, m)	50,05	1,29 (1H, m)	61,88
10		36,90		38,66
11	1,56 (1H, m), 1,82 (1H, m)	23,93	2,20 (1H, dt, J = 15,6, 5,2 Hz) 2,44 (1H, dt, J = 15,7, 7,3 Hz)	23,14
12	1,70 (1H, m), 1,84 (1H, m)	36,58	5,48 (1H, t, J = 7,4 Hz)	133,42
13		44,92		131,12
14		54,23	6,87 (1H, dd, J = 17,2, 10,7 Hz)	133,47
15	1,56 (2H, m)	34,54	5,13 (1H, d, J = 10,8 Hz) 5,22 (1H, d, J = 17,3 Hz)	114,02
16	1,31 (1H, m), 1,99 (1H, m)	29,82	1,80 (3H, s)	19,96
17	1,56 (1H, m)	54,99	1,19 (3H, s)	24,42
18	0,99 (1H, s)	24,31	1,00 (3H, s)	28,19
19	1,02 (3H, s)	25,02	0,77 (3H, s)	15,44
20	2,05 (1H, m)	34,78	0,85 (3H, s)	15,52
21	0,90 (3H, d, J = 6,4 Hz)	19,99		
22	2,26 (1H, dd, J = 15,4, 2,9 Hz) 2,65 (1H, dd, J = 15,4, 9,7 Hz)	52,80		
23		205,02		
24	7,03 (1H, s)	132,29		
25		145,12		
26		172,33		
27	2,16 (3H, s)	15,15		
28	0,96 (3H, s)	29,43		
29	0,92 (3H, s)	24,04		
30	1,08 (3H, s)	31,26		

^a Spectres réalisés avec CDCl₃

^b Spectres réalisés avec MeOD

4.5 Isolation du 3 β -hydroxy-abiénol (89)

Le 3 β -hydroxy-abiénol a été isolé d'une toute autre façon. Tout d'abord, une partie du filtrat obtenu après la trituration de la résine (100,2 g) a été séparé par extraction liquide/liquide avec de l'éther de pétrole et du NaOH 2% de manière à séparer les composés acides (21,4 g) des composés neutres (35,6 g) de la résine (figure 18) (Gray and Mills 1964).

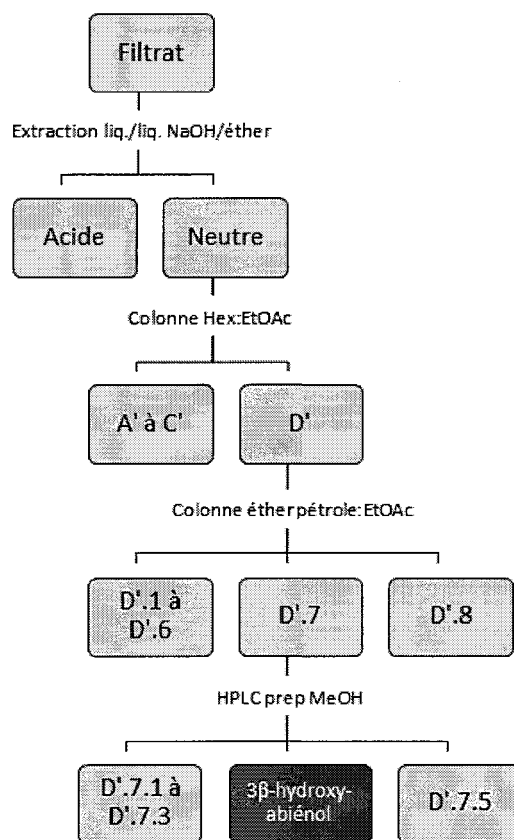


Figure 18 – Schéma de fractionnement du filtrat hexane.

Un aliquot de la fraction neutre (30,0 g) a été purifiée sur colonne de silice avec le gradient hexanes-EtOAc (35:1 → 15:1) et finalement lavée au méthanol afin d'obtenir quatre sous-fractions A'-D'. La fraction D' (2,8 g) a été ensuite passée sur colonne de silice en utilisant un système d'élution composé d'éther de pétrole-EtOAc (25:1 → 15:1 → 10:1 → 1:1) et suivi d'un lavage au méthanol de manière à obtenir huit nouvelles fractions nommées D'.1 à D'.8. La fraction D'.7 a été purifiée par HPLC préparatif avec un gradient de 60% → 96% méthanol dans l'eau permettant d'obtenir le 3 β -hydroxy-abiénol (**89**, 6,1 mg) sous forme de poudre blanche amorphe.

Après une recherche approfondie dans la littérature et après analyse des données RMN (tableau 3, annexes 3 et 4), il en ressort que le composé **89** n'a jamais été rapporté auparavant. Une molécule comportant la même structure (mais pas la même stéréochimie) a bel et bien été isolée, mais sous forme d'*ent*-labdane (Bohlmann *et al.* 1981). Les auteurs de cet article s'avancent sur cette configuration absolue en comparant l'indice de rotation de leur molécule avec celui de l'abienol (un labdane). Bien que ces deux indices soient de signes opposés, l'abienol ne possède pas de groupement hydroxyle sur le C-3 contrairement à leur composé. Cela rend les indices de rotation non comparables car la structure de base des molécules n'est pas la même. Concernant la molécule **89**, il est possible de conclure qu'il s'agit d'un labdane (et non d'un *ent*-labdane) par comparaison avec tous les labdanes isolés du genre *Abies* qui sont de configuration *normale* et non *ent*-, sachant qu'une plante ne produit généralement qu'une seule des deux configurations (Yang, Li *et al.* 2008; Munoz *et al.* 2012). Finalement, la configuration relative des fonctions hydroxyles en C-3 et C-8 a été déterminée par NOESY comme étant différente de

celle rapportée dans l'article de Bohlmann. En effet, H-3 corrèle avec H-5 et H₃-18, ce qui montre que ces groupes sont positionnés du même côté de la molécule. Ensuite, les corrélations NOESY entre H₂-11, H₃-17 et H₃-20 ainsi que celle entre H₂-6 β , H₃-19 et H₃-20 ont permis de conclure que le groupement hydroxyle sur le C-3 est en position beta tandis que celui sur le C-8 est orienté en alpha.

4.6 Activités biologiques des molécules isolées

Les activités cytotoxiques des composés qui ne sont pas présentés dans l'article scientifique ainsi que ceux des fractions initiales sont compilées dans le tableau 4. Elles sont toutes exprimées en IC₅₀, soit la concentration nécessaire pour inhiber de 50% la croissance cellulaire. Le précipité provenant de l'oléorésine possède une bonne activité cytotoxique pour un extrait brut, soit de 30 ± 3 $\mu\text{g/ml}$ sur les cellules d'adénocarcinome pulmonaire (A-549) et de 31 ± 2 $\mu\text{g/ml}$ sur les cellules du cancer du côlon (DLD-1). C'est donc la raison pour laquelle cette fraction a été travaillée en premier.

Tableau 4 – Activités cytotoxiques des fractions brutes et des molécules pures isolées.

Composés ou extraits	A-549 (IC ₅₀ *)	DLD-1 (IC ₅₀ *)	WS-1 (IC ₅₀ *)
Oléorésine	69 ± 8	72 ± 4	38 ± 3
Précipité	30 ± 3	31 ± 2	55 ± 4
Filtrat hexane	58 ± 5	56 ± 2	46 ± 12
86	>100	>100	>100
87	84 ± 6	91 ± 6	>100
88	66 ± 4	58 ± 5	>100
89	>100	>100	>100
Etoposide (IC ₅₀ en µM)	< 0,4	< 0,6	< 8,0

* Exprimés en µg/ml pour les extraits et µM pour les composés purs.

Concernant les produits isolés, le composé **88** est celui qui démontre l'effet le plus marqué avec une valeur de 66 ± 4 µM sur les cellules A-549 et de 58 ± 5 µM sur les cellules DLD-1. Par contre, ces valeurs ne permettent pas de dire que ce composé possède une activité cytotoxique significative. Les trois autres molécules quant à elles n'ont pas démontré d'activité cytotoxique intéressante, variant de 84 ± 6 µM à plus de 200 µM. Concernant les molécules présentées dans l'article scientifique et isolées lors de mon projet, seulement la molécule **6** présente une faible cytotoxicité sur les cellules A-549 (IC₅₀ = 22 µM)

Les activités antibactériennes des composés qui ne sont pas présentés dans l'article scientifique sont compilées dans le tableau 5. Aucune des molécules isolées n'a d'effet sur *E. coli*. Concernant l'activité sur *S. aureus*, le précipité et le filtrat hexane possèdent tous les deux une bonne activité antibactérienne sur *S. aureus* après 6h, soit de $2,7 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ et de $2,3 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Tableau 5 – Activité antibactérienne des fractions brutes et des molécules pures isolées.

Composés ou extraits	<i>S. aureus</i> (IC ₅₀ *)		<i>E. Coli</i> (IC ₅₀ *)	
	6h	24h	6h	24h
Oléorésine	$2,7 \pm 0,5$	63 ± 5	>100	>100
Précipité	$2,3 \pm 0,4$	>100	>100	>100
Filtrat hexane	$6,0 \pm 1,0$	>100	>100	>100
86	41 ± 2	>100	>100	>100
87	8 ± 1	>100	>100	>100
88	$4,6 \pm 0,1$	>100	>100	>100
89	>100	>100	>100	>100
Gentamycine (IC ₅₀ en μM)	< 0,002	< 0,02	< 0,006	< 0,02

* Exprimés en $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits et μM pour les composés purs.

Parmi les composés isolés et testés sur les bactéries, les composés **87** et **88** sont ceux qui présentent la meilleure activité après 6 heures, mais qui semblent peu actifs après 24 heures. Cette diminution de l'activité a également été observée avec les fractions brutes initiales (précipité et filtrat hexane). Il est donc possible de soupçonner une activité

bactériostatique, bien qu'il faille pousser plus loin les études sur le mécanisme d'action de ces produits pour en faire la preuve. Les molécules présentées dans l'article scientifique et isolées lors de mon projet n'ont pas exprimé d'activité antibactérienne notable, à l'exception des composés **1** et **4** ayant démontré une CMI de 25 μ M sur *S. aureus*.

Il est important de mentionner que plusieurs des fractions travaillées lors de ce projet ont démontré des activités antibactériennes très intéressantes sur *S. aureus*, sans que la molécule responsable de leur activité soit identifiée. Dans le but de donner un ordre de grandeur, certaines fractions exprimaient une IC_{50} après 24h de $2,87 \pm 0,09$ et de $3,5 \pm 0,8$ μ g/ml (fractions BC.2.3 et BC.2.4). Il en est de même pour certaines fractions qui possédaient une activité cytotoxique relativement marquée sans que le composé responsable ait pu être isolé. C'est le cas par exemple des fractions BC.3 et BC.4 dont la valeur IC_{50} sur les cellules A-549 était de respectivement $6,6 \pm 0,9$ et $2,7 \pm 0,3$ μ g/ml.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Les travaux rapportés dans ce mémoire ainsi que la revue de littérature effectuée ont permis de mettre en lumière la grande diversité chimique de la résine de sapin baumier. En effet, les travaux effectués sur cette matrice végétale ont mené à l'identification de nouvelles molécules appartenant à des squelettes connus (labdanes, triterpènes de type lanostane et cycloartane, etc.), mais également à de nouveaux composés de la famille peu connue des tétraterpènes. L'ensemble des résultats obtenus suggère que la résine contient probablement d'autres composés originaux qui pourraient être étudiés à la suite de ce travail. La trituration de la résine dans l'hexane est la méthode de choix pour débiter le fractionnement car elle permet de concentrer les composés de poids moléculaires plus élevés dans une fraction sous forme de poudre, beaucoup plus facile à travailler.

L'investigation de la résine de sapin baumier à l'aide de techniques chromatographiques modernes a permis de rapporter dans ce mémoire l'isolation de 13 molécules appartenant à la classe des di- et des triterpènes, dont trois nouveaux composés jamais rapportés dans la littérature, soit l'acide 3α -hydroxy-23-oxocycloart-25(27)-èn-26-oïque, l'acide 3α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque et le 3β -hydroxy-abiénol.

Bien que le précipité et le filtrat hexane obtenus tous deux du fractionnement grossier de la résine de sapin possédaient des activités bactériostatiques et cytotoxiques intéressantes à exploiter, aucun des composés purs isolés de ces deux fractions n'a une activité biologique supérieure à celle déterminée pour les fractions brutes. À cet effet, l'acide firmanoïque (88) et la molécule 6 de l'article scientifique sont les molécules dont l'effet cytotoxique est le plus marqué. Quant à eux, l'acide 3α -hydroxy-23-oxolanosta-

7,24E-diène-26-oïque (87), l'acide firmanoïque (88) et les molécules 1 et 4 rapportées dans l'article sont celles qui ont le meilleur effet antibactérien sur *S. aureus*.

L'objectif principal qui était d'isoler et de caractériser les composés bioactifs de la résine de sapin baumier a donc été partiellement atteint. Plusieurs des autres fractions obtenues lors des séparations subséquentes ont démontrés des activités antibactériennes et cytotoxiques plus intéressantes que les fractions mères. Des travaux supplémentaires seront donc nécessaires pour isoler et caractériser les composés responsables des activités biologiques de la résine. Il est important de mentionner qu'une synergie entre les composés isolés est également possible. Cependant, cette possibilité n'a pas été évaluée dans le cadre de ce projet. L'utilisation de fractions purifiées de la résine dans le domaine des produits de santé naturels pourrait être une voie de valorisation de ce PFNL dans l'éventualité où une synergie pourrait réellement être identifiée.

La purification des autres fractions actives qui n'ont pas pu être travaillées est une voie intéressante pour continuer le projet sur les bases déjà établies. De plus, les tests biologiques généralement employés pour évaluer les activités antibactériennes et cytotoxiques étant réalisés en milieu aqueux, certains problèmes de diffusion et de solubilité des extraits non polaires obtenus peuvent survenir. La possibilité de tester l'activité biologique de ces extraits en utilisant des tests biologiques adaptés au caractère non polaire de la résine serait à considérer pour la suite du projet.

CHAPITRE 6

RÉFÉRENCES

- AAC. (2007). "Ginseng." Retrieved 25 septembre 2011, from <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1174595100553&lang=eng>.
- AAC. (2011). "Bulletin d'information en agroforesterie Québec - Atlantique." Retrieved 31 mars 2013, from http://www.agrireseau.qc.ca/agriculturebiologique/documents/Bulletin_Agroforesterie_Qc-Atl_vol2_no2_nov.2011_FRA.pdf.
- Abad, A., M. Arno, *et al.* (1991). "Synthesis of (-)-auricularic acid and its C-4 epimer the absolute configuration of auricularic acid." *Tetrahedron* **47**(23): 3829-3844.
- Alvarez-Manzaneda, E. J., R. Chahboun, *et al.* (2006). "New route to 15-hydroxydehydroabietic acid derivatives: Application to the first synthesis of some bioactive abietane and nor-abietane type terpenoids." *Tetrahedron Letters* **47**(15): 2577-2580.
- Balogh, B., A. Burlinga, *et al.* (1972). "4,4-dimethyl-2-cyclohepten-1-one in Cortical Oleoresin of *Abies Balsamea*." *Phytochemistry* **11**(4): 1481.
- Banfi, E., G. Scialino, *et al.* (2003). "Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**(5): 796-800.
- Bishara, A., A. Rudi, *et al.* (2007). "Three biscembranoids and their monomeric counterpart cembranoid, a biogenetic Diels-Alder precursor, from the soft coral *Sarcophyton elegans*." *Journal of Natural Products* **70**(12): 1951-1954.
- Bohlmann, F., C. Zdero, *et al.* (1981). "Germacranolides, a guaianolide with a beta-lactone ring and further constituents from *Grazielia* species." *Phytochemistry* **20**(5): 1069-1075.
- Bohlmann, J., J. Crock, *et al.* (1998). "Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12): 6756-6761.
- Bowers, W. S., H. M. Fales, *et al.* (1966). "Juvenile Hormone - Identification of an Active Compound from Balsam Fir." *Science* **154**(3752): 1020-&.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Wiley-VCH.
- Connolly, J. D. and R.A.Hill (1991-a). *Dictionary of Terpenoids, Vol. 1: Mono- and sesquiterpenoids*. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, Chapman & Hall.
- Connolly, J. D. and R.A.Hill (1991-b). *Dictionary of Terpenoids, Vol. 2: Di- and higher terpenoids*. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, Chapman & Hall.
- Cotarca, L. and H. Eckert (2006). *Phosgenations: A Handbook*, John Wiley & Sons.
- Dayisoğlu, K. S., A. D. Duman, *et al.* (2009). "Antimicrobial activity of the essential oils of rosin from cones of *Abies cilicica* subsp *cilicica*." *African Journal of Biotechnology* **8**(19): 5021-5024.
- Ebnesajjad, S. (2010). *Handbook of adhesives and surface Preparation*. Oxford, William Andrew.
- Enzell, C. R., A. Nasiri, *et al.* (1995). "Tobacco Chemistry. 81. Biotransformations of (Z)-Abienol Using Plant-Cell Cultures of *Nicotiana glauca*." *Acta Chemica Scandinavica* **49**(5): 375-379.
- Feio, S. S., B. Gigante, *et al.* (1999). "Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives." *Journal of Microbiological Methods* **35**(3): 201-206.
- Feller, M., A. Rudi, *et al.* (2004). "Isoprenoids of the soft coral *Sarcophyton glaucum*: Nyalolide, a new biscembranoid, and other terpenoids." *Journal of Natural Products* **67**(8): 1303-1308.
- Fortin, J.-J. (2013). "Nos produits." Retrieved [Consulté le 13 janvier 2013], from www.gommesdesapin.com.
- Gagnon, D. (2004). "La forêt du Québec, un survol." Retrieved 25 septembre 2011, from http://www.commission-foret.qc.ca/pdf/Gagnon_foret_naturelle_final.pdf.

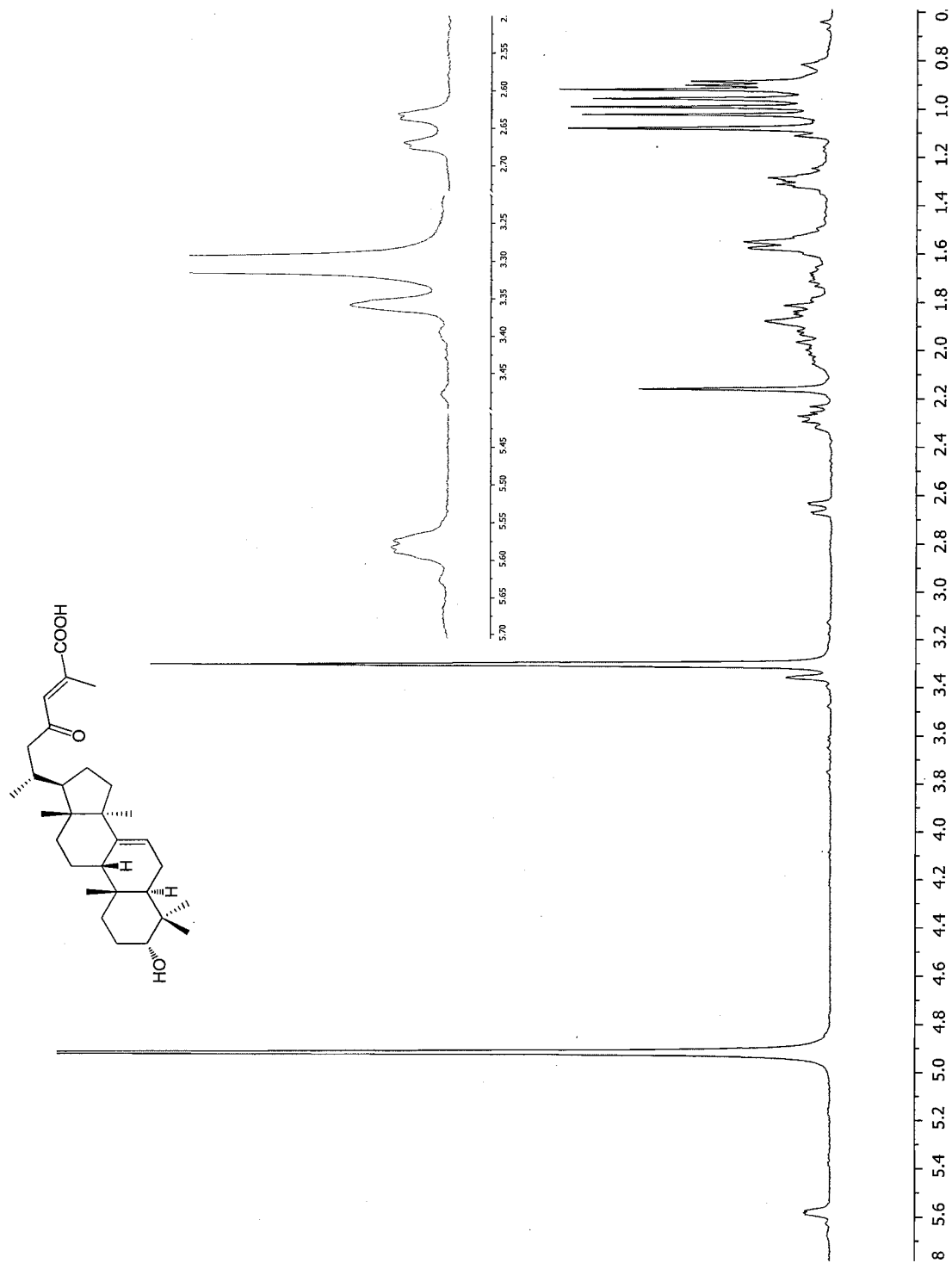
- Gassama, I., S. Morel, *et al.* (2010). "Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008." from http://www.forestierenchef.gouv.qc.ca/images/stories/BAFD/accueil/bilan_2000-2008.pdf.
- Gray, P. S. and J. S. Mills (1964). "Isolation of Abienol from Canada Balsam Oleoresin of *Abies Balsamea* (L.) Mill." *Journal of the Chemical Society S*: 5822.
- Gray, P. S. and J. S. Mills (1964). "Isolation of abienol from Canada balsam oleoresin of *Abies Balsamea* (L.) Mill." *Journal of the Chemical Society S*: 5822-5825.
- Hasegawa, S., N. Kaneko, *et al.* (1987). "Triterpenes from the Seed of *Abies firma*." *Phytochemistry* **26**(4): 1095-1099.
- Hasegawa, S., T. Miura, *et al.* (1985). "A New Rearranged Lanostanoid, Mariesiic acid A, from the Seed of *Abies Mariesii*." *Chemistry Letters*(10): 1589-1592.
- He, F., X. Y. Li, *et al.* (2012). "Nortriterpene constituents from *Schisandra sphenanthera*." *Tetrahedron* **68**(2): 440-446.
- Herrick, J. W. and D. R. Snow (1995). *Iroquois medical botany*, Syracuse University Press.
- Himejima, M., K. R. Hobson, *et al.* (1992). "Antimicrobial Terpenes from Oleoresin Of Ponderosa Pine Tree *Pinus Ponderosa* - A Defense Mechanism Against Microbial Invasion." *Journal of Chemical Ecology* **18**(10): 1809-1818.
- Hughes, A. B. (2011). *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*, John Wiley & Sons.
- Iwagawa, T., K. Hashimoto, *et al.* (2006). "Biscembranes from the soft coral *Sarcophyton glaucum*." *Journal of Natural Products* **69**(8): 1130-1133.
- Kim, H. J., E. H. Choi, *et al.* (2004). "Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*." *Phytochemistry* **65**(18): 2545-2549.
- Kingston, D. G. I. (2011). "Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation." *Journal of Natural Products* **74**(3): 496-511.
- Kusumi, T., M. Igari, *et al.* (1990). "A Novel Chlorinated Biscembranoid from the Marine Soft Coral *Sarcophyton glaucum*." *Journal of Organic Chemistry* **55**(26): 6286-6289.
- Lan, W. J., S. L. Wang, *et al.* (2009). "Additional New Tetracyclic Tetraterpenoid: Methyl Tortuoate D from Soft Coral *Sarcophyton tortuosum*." *Natural Product Communications* **4**(9): 1193-1196.
- Lavoie, S., J. Legault, *et al.* (2012). "Abibalsamins A and B, Two New Tetraterpenoids from *Abies balsamea* Oleoresin." *Organic letters* **14**(6): 1504-1507.
- Legault, J. and A. Pichette (2007). "Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59**(12): 1643-1647.
- Leibyuk, T. V., É. N. Schmidt, *et al.* (1990). "Triterpenoids from *Abies* species X. Two new 3,4-secotriterpene acids from the oleoresin of the silver fir." *Chemistry of Natural compounds* **26**(6): 651-655.
- Li, F., S. Awale, *et al.* (2009). "Cytotoxic Constituents of Propolis from Myanmar and Their Structure-Activity Relationship." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **32**(12): 2075-2078.
- Li, Y. L., S. D. Zhang, *et al.* (2012). "Abiestetranes A and B, two unique tetraterpenes from *Abies fabri*." *Tetrahedron* **68**(38): 7763-7767.
- Mabberley, D. J. (2008). *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge, Cambridge University Press: 1.
- Mabberley, D. J. (2008). *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge.

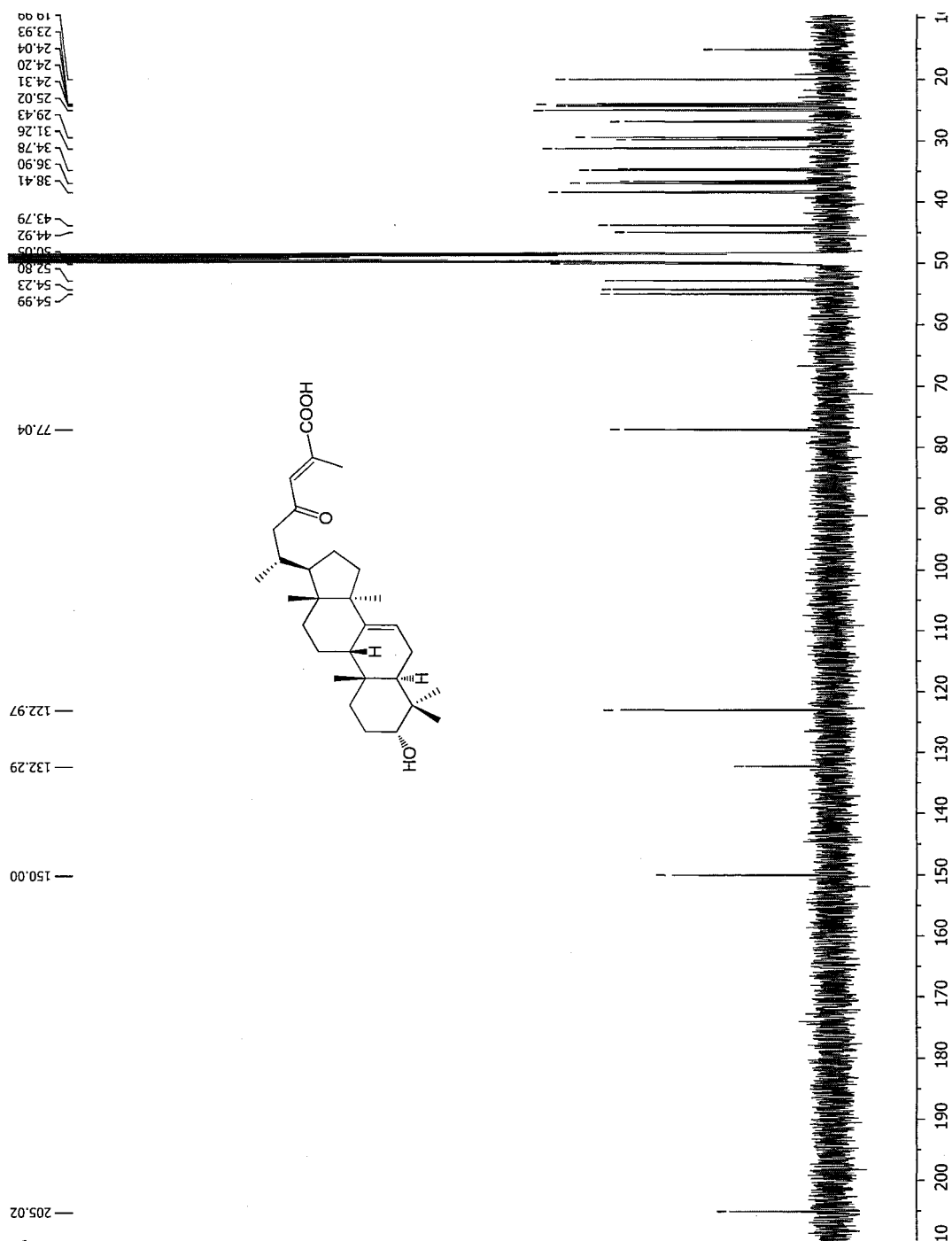
- Manville, J. F. (1976). "Juvabione and its Analogs. 2. Isolation, Identification and Occurrence of Juvabiol and its Epimer Isojuvabiol from Whole Wood of *Abies Balsamea*." Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **54**(15): 2365-2371.
- Marie-Victorin, F. (2002). Flore laurentienne. Montréal.
- Moerman, D. E. (1998). Native American ethnobotany, Timber Press.
- Munoz, M. A., A. Urzua, *et al.* (2012). "Determination of absolute configuration of salvic acid, an ent-labdane from *Eupatorium salvia*, by vibrational circular dichroism." Phytochemistry **80**: 109-114.
- Nascimento, A. M. A., M. G. L. Brandao, *et al.* (2007). "Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **92**(1): 95-100.
- NRC. (2013). "Balsam fir." Retrieved 1 avril 2013, from <http://tidcf.nrcan.gc.ca/trees/factsheet/80>.
- O'Brien, J., I. Wilson, *et al.* (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." European Journal of Biochemistry **267**: 5421-5426.
- Ochei, J. and A. Kolhatkar (2000). Medical Laboratory Science - Theory and Practice. New Delhi, Tata McGraw-Hill Education.
- Parent, B. (2010). "Ressources et industries forestières – Portraits statistique édition 2010." Retrieved 23 septembre 2011, from http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/stat_edition_complete/complete2010.pdf.
- Pichette, A., P. L. Larouche, *et al.* (2006). "Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil." Phytotherapy Research **20**(5): 371-373.
- Raldugin, V. A., Y. V. Gatilov, *et al.* (1986). "Triterpenoids from *Abies* species. 1. Abiesonic Acid as a Triterpenoid with the New Carbon Skeleton from *Abies sibirica* Sap." Khimiya Prirodnikh Soedinenii(5): 584-588.
- Raldugin, V. A., Y. V. Gatilov, *et al.* (1986). "Triterpenoids from species of *Abies* Hill. II. Abiesolidic acid - A new 3,4-secolanostanoid from the oleoresin of *Abies sibirica*." Chemistry of Natural Compounds **22**(6): 645-651.
- Raldugin, V. A., T. P. Kukina, *et al.* (1987). "Triterpenoids of *Abies* Species. 3. 24-methylene-3,4-seco-cycloart-4(28)-en-3-ic acid from *Abies sibirica* Needles." Khimiya Prirodnikh Soedinenii(2): 306-307.
- Roshchin, V. I., V. A. Raldugin, *et al.* (1986). "New triterpene acids from *Abies sibirica* needles." Chemistry of Natural Compounds **22**: 613-614.
- Roshchin, V. I., V. A. Raldugin, *et al.* (1986). "New triterpene acids from *Abies sibirica* needles." Chemistry of Natural Compounds **22**(5): 613-614.
- Sapino. (2013). "Nos produits." Retrieved [Consulté le 13 janvier 2013], from www.sapino.com.
- Shang, N., J. A. Guerrero-Analco, *et al.* (2012). "Adipogenic constituents from the bark of *Larix laricina* du Roi (K. Koch; Pinaceae), an important medicinal plant used traditionally by the Cree of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of type 2 diabetes symptoms." Journal of Ethnopharmacology **141**(3): 1051-1057.
- Shevtsov, S. A. and V. A. Raldugin (1989). "Triterpenoids from *Abies* species - VIII. A new methoxymariesionoid and two 3,4-secomariesionoids from *Abies sibirica* needles." Chemistry of Natural Compounds **25**(2): 182-187.
- Singh, R. K., B. L. Pandey, *et al.* (2001). "Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol." Fitoterapia **72**(2): 168-170.

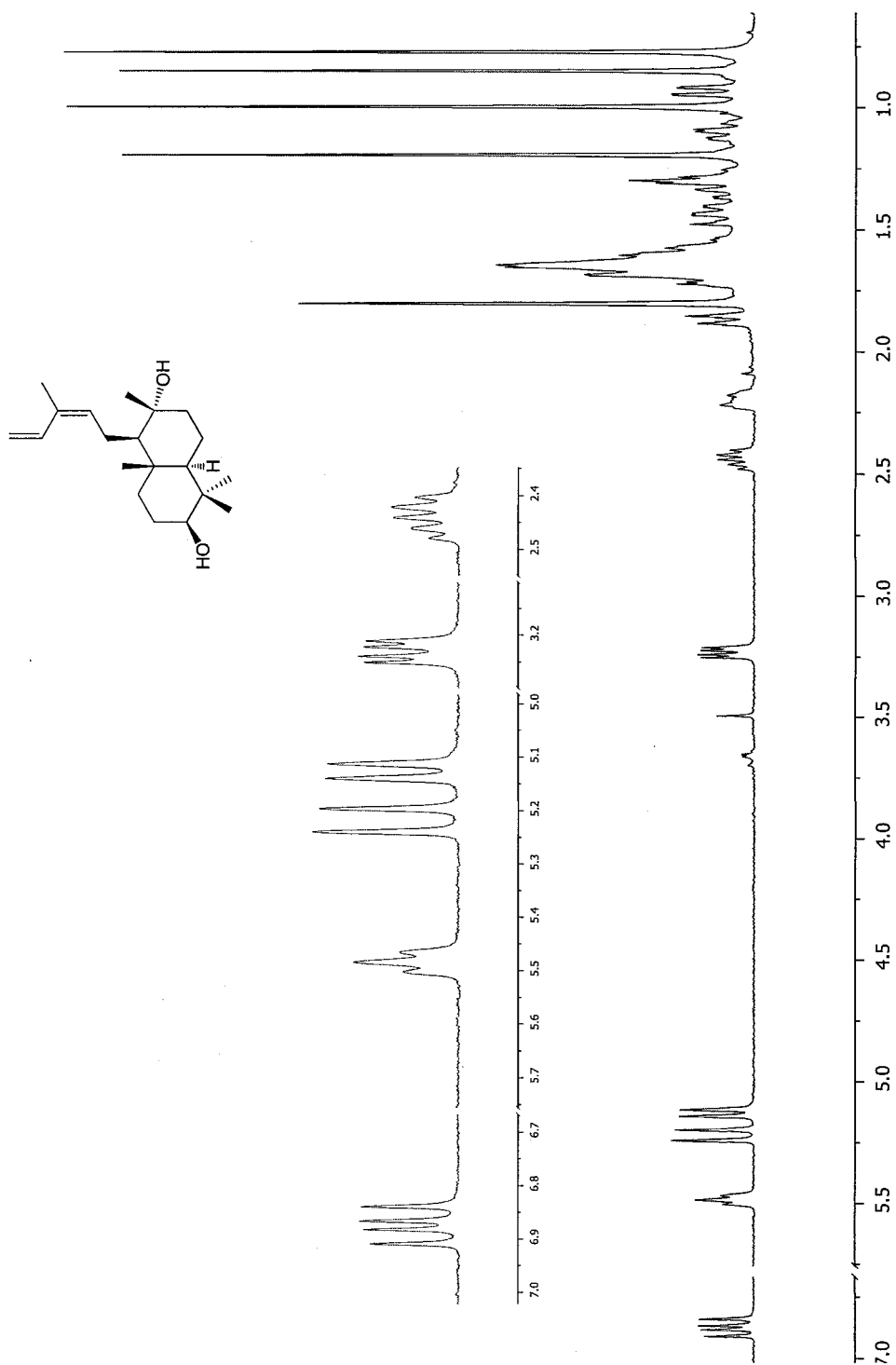
- Smedman, L. A., K. Snajberk, *et al.* (1969). "Oxygenated monoterpenoids and sesquiterpenoid hydrocarbons of the cortical turpentine from different *Abies* species." *Phytochemistry* **8**: 1471-1479.
- StatCan. (2010). "Les arbres de Noël... en chiffres." Retrieved 26 septembre 2011, from http://www42.statcan.ca/smr08/2010/smr08_148_2010-fra.htm.
- Takahashi, T. (1938). "Über die Konstitution des kristallinen Bestandteils in Rinden und Blättern von *Abies mariesii*, Mast., (I. Mitteil.)." *J. Pharm. Soc. Jpn* **58**(10): 888-901.
- Termentzi, A., N. Fokialakis, *et al.* (2011). "Natural Resins and Bioactive Natural Products thereof as Potential Antimicrobial Agents." *Current Pharmaceutical Design* **17**(13): 1267-1290.
- Tigner, D. (2011). Atlas des arbres de l'Ontario : Sapin baumier (*Abies balsamea*), Ministère des richesses naturelles Ontario. **2012**.
- Tiwari, K. P. and P. K. Minocha (1980). "A chalcone glycoside from *Abies pindrow*." *Phytochemistry* **19**(11): 2501-2503.
- Turgeon, M. (2003). "Aperçu des Produits forestiers non Ligneux." Retrieved 28 mai 2011, from http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/entreprises/apercu_PFNL.pdf.
- Wada, S., A. Iida, *et al.* (2002). "Triterpenoid constituents isolated from the bark of *Abies sachalinensis*." *Journal of Natural Products* **65**(11): 1657-1659.
- Wada, S. I., A. Iida, *et al.* (2002). "Triterpenoid constituents isolated from the bark of *Abies sachalinensis*." *Journal of Natural Products* **65**(11): 1657-1659.
- Wahlberg, I., K. Karlsson, *et al.* (1978). "Tobacco Chemistry. 43. Sensitized photo-oxygenation of (12Z)-abienol. Biomimetic synthesis of Tobacco labdanoids." *Acta Chemica Scandinavica B* **32**: 203-215.
- Wahlberg, I., C. Vogt, *et al.* (1982). "Tobacco Chemistry. 57. Two New Labdanic Compounds from Tobacco." *Acta Chemica Scandinavica B* **36**: 573-576.
- Wang, J. R., T. Kurtán, *et al.* (2012). "Structure and absolute stereochemistry of nortriterpenoids from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill." *European Journal of Organic Chemistry*(28): 5471-5482.
- Xia, J. H., S. D. Zhang, *et al.* (2012). "Sesquiterpenoids and triterpenoids from *Abies holophylla* and their bioactivities." *Phytochemistry* **74**: 178-184.
- Yang, X. W., S. M. Li, *et al.* (2008). "Abiesanordines A-N: fourteen new norditerpenes from *Abies georgei*." *Tetrahedron* **64**(19): 4354-4362.
- Yang, X. W., S. M. Li, *et al.* (2008). "Phytochemical and biological studies of *Abies* species." *Chemistry & Biodiversity* **5**(1): 56-81.
- Yang, X. W., S. M. Li, *et al.* (2010). "Abiesatrines A-J: anti-inflammatory and antitumor triterpenoids from *Abies georgei* Orr." *Organic & Biomolecular Chemistry* **8**(11): 2609-2616.
- Yoneyama, S., I. Togashi, *et al.* (1990). "AN ANTIFUNGAL SUBSTANCE IN THE VOLATILE WOOD-OIL OF TODOMATSU, ABIES-SACHALINENSIS MAST." *Mokuzai Gakkaishi* **36**(9): 777-780.
- Zhang, Y., Y. Lu, *et al.* (2005). "Tagalsins I and J, two novel tetraterpenoids from the mangrove plant, *Ceriops tagal*." *Organic Letters* **7**(14): 3037-3040.
- Zhao, Y. X., L. Zhou, *et al.* (2005). "A new diterpenoid and active stilbenes from *Pinus armandii* heartwood." *Journal of Asian Natural Products Research* **7**(3): 259-264.

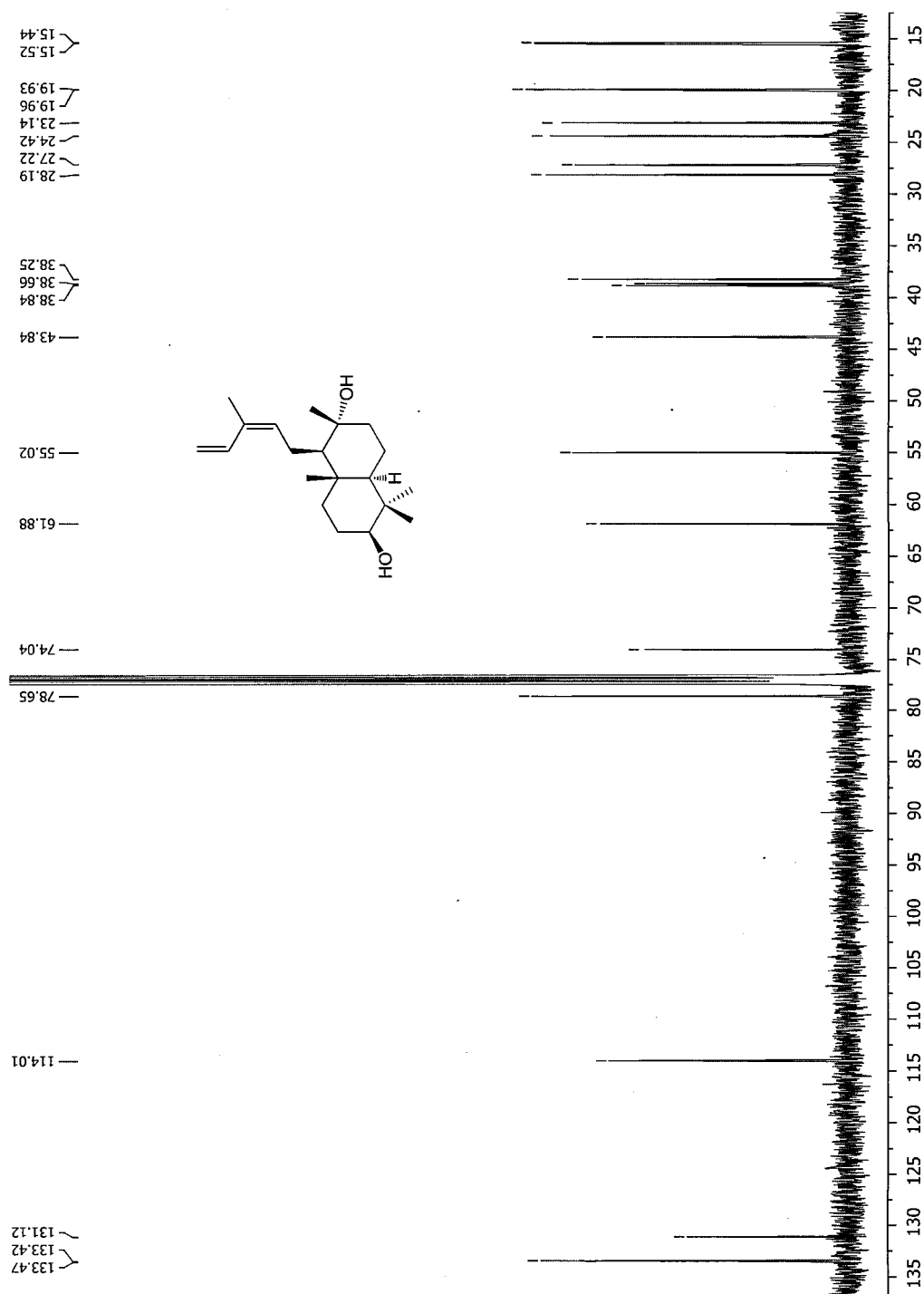
CHAPITRE 7

ANNEXES

Annexe 1 – RMN ^1H de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (87)

Annexe 2 – RMN ^{13}C de l'acide 3 α -hydroxy-23-oxolanosta-7,24E-dièn-26-oïque (87)

Annexe 3 – RMN ^1H du 3 β -hydroxy-abiénol (89)

Annexe 4 – RMN ^{13}C du 3 β -hydroxy-abiénol (89)

Annexe 5 – Liste des abréviations

Abréviations générales

A-549	Cellules cancéreuses du poumon
AAC	Agriculture et agroalimentaire Canada
Ara	Arabinose
CCM	Chromatographie sur couche mince
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DLD-1	Cellules cancéreuses du colon
EC ₅₀	Concentration efficace pour inhiber 50% de l'activité
EtOAc	Acétate d'éthyle
Gal	Galactose
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
Glc	Glucose
HCOOH	Acide formique
Hex	Hexanes
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentration inhibant 50% de l'activité
LASEVE	Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales
LPLC	Chromatographie liquide basse pression
Me	Groupe méthyl
MeO	Groupe méthoxy
MeOH	Méthanol
NaOH	Hydroxyde de sodium
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NRC	<i>National Research Council Canada</i>
PFNL	Produits forestiers non ligneux
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rut	Rutine
StatCan	Statistiques Canada
WS-1	Cellules de fibroblastes humain

Abréviations pour la RMN

br s	Singulet large (<i>broad singlet</i>)
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
δ	Déplacement chimique
d	Doublet
dd	Doublet dédoublé
dt	Doublet détriplé
J	Constante de couplage
m	Multiplet
MeOD	Méthanol deutéré
s	Singulet
t	Triplet

