

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

Par

MARIE-EVE BRADETTE HÉBERT

B. Sc. CHIMIE

ÉTUDE DU POTENTIEL BIOPHARMACEUTIQUE DU
Solidago canadensis Linné

MAI 2008



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet de recherche était de valoriser la biomasse de la forêt boréale notamment par l'étude du potentiel anti-inflammatoire d'extraits et de composés issus de la forêt boréale. Ainsi, des plantes potentiellement anti-inflammatoires de la forêt boréale ont été sélectionnées en se basant sur la médecine traditionnelle amérindienne. Les différentes parties (fleurs, feuilles, tiges et racines) des plantes sélectionnées ont été extraites par Soxhlet et les activités anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse des différents extraits ont été évaluées. Au cours de ce projet de maîtrise, il a été démontré que les fleurs de *Solidago canadensis* possèdent une activité anti-inflammatoire. De plus, les fleurs, les feuilles et les tiges de *Solidago canadensis* ont montré une activité antioxydante. Par conséquent, ces résultats supportent l'utilisation ethnopharmacologique de cette plante par les peuples ancestraux de l'Amérique du Nord. L'extrait de fleurs de *Solidago canadensis* a été sélectionné et les composés majoritaires de la fraction aqueuse ont été isolés par chromatographie et HPLC préparatif. La caractérisation par résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse a mené à l'identification de ces composés. De la sorte, cinq dérivés connus d'acide caffeoylquinique ont été isolés : l'acide 3-*O*-caffeoylquinique (acide néochlorogénique), l'acide 5-*O*-caffeoylquinique (acide chlorogénique), l'acide 4,5-di-*O*-caffeoylquinique, l'acide 3,5-di-*O*-caffeoylquinique et l'acide 3,4-di-*O*-caffeoylquinique. Toutefois, il s'avère que ces composés ne sont pas responsables de l'activité anti-inflammatoire observée pour l'extrait. Au cours de ce projet, l'acide 3,4-di-*O*-caffeoylquinique a été rapporté pour la première fois à partir du *Solidago canadensis*. Également, les travaux de séparation ont mené à l'isolation de la quercétine et du 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadièn-15,16-olide (solicanolide), un nouveau diterpène de la famille des labdanes. Ce nouveau composé a démontré une activité anticancéreuse intéressante sur les lignées cellulaires A-549, DLD-1 et WS1. Cependant, les autres composés isolés se sont révélés inactifs.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je désire remercier mes codirecteurs, M. Jean Legault, Ph. D. et M. André Pichette, Ph. D. de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise au sein de leur groupe de recherche. Au cours de ce projet, j'ai pu acquérir plusieurs connaissances au niveau scientifique ainsi que professionnel, qui constituent un atout de taille dans mon évolution personnelle.

Je tiens spécialement à remercier M. Vakhtang Mshvildadze, Ph. D. pour avoir partagé son immense savoir en ce qui concerne la phytochimie, l'isolation et la culture géorgienne. Merci à M. Serge Lavoie, pour ses nombreux conseils, son support inestimable et le temps investi à satisfaire mes multiples requêtes et interrogations. Je remercie Mme Carole Grenon pour son appui incontestable, son éternelle patience et sa complicité. Merci à Mme Angélique Longtin pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, à M. Karl Girard Lalancette pour l'évaluation de l'activité antioxydante et à M. Maxime Lebrun pour l'évaluation de l'activité anticancéreuse. Merci également à tous ceux qui font partie de notre groupe de recherche et qui ont pu contribuer de près ou de loin à ce projet.

Je remercie Mme Karine Auclair, Ph. D. de m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche lors de mon stage à l'Université McGill de Montréal. Cette expérience de travail en milieu anglophone constituait un défi de taille et s'est révélée largement profitable.

Merci à ma famille, à ceux qui croient en moi, qui me soutiennent et m'encouragent dans tout ce que j'entreprend. Je suis particulièrement reconnaissante envers mon conjoint, Vincent Auclair, qui par sa présence m'apporte l'énergie, la confiance et la motivation qui me permettent de mener à terme chacune de mes réalisations. Merci du fond du coeur!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ANNEXES.....	ix
 I. INTRODUCTION.....	 1
1.1 Problématique.....	2
1.2 Objectifs.....	6
1.3 Structure du mémoire.....	7
 II. REVUE DE LITTÉRATURE : <i>Solidago canadensis</i> Linné.....	 8
2.1 Botanique.....	9
2.2 Usages.....	12
2.3 Phytochimie.....	13
2.4 Pharmacologie.....	20
 III. A New Labdane Diterpene from the Flowers of <i>Solidago canadensis</i>.....	 21
Article publié dans <i>Chemical and Pharmaceutical Bulletin</i> , 56 (1), 82-84, 2008.	
Résumé.....	22
Article.....	23

IV. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts from <i>Solidago canadensis</i>.....	26
Article en préparation pour <i>Journal of Ethnopharmacology</i> .	
Résumé.....	27
Abstract.....	29
1. Introduction.....	30
2. Materials and methods.....	31
2.1 General experimental procedures.....	31
2.2 Plant material.....	32
2.3 Extraction and isolation.....	32
2.4 Cell culture.....	33
2.5 Cytotoxic assay.....	34
2.6 Measurement of the antioxidant activity by ORAC _{FL} assay.....	34
2.7 Measurement of anti-inflammatory activity by nitric oxide (NO) inhibition on LPS-activated RAW 264.7 macrophages	35
3 Results and discussion.....	36
3.1 Extraction yields.....	36
3.2 Antioxidant activity of methanol extracts	36
3.3 Macrophages cytotoxicity and anti-inflammatory activity of extracts...37	
3.4 Isolation of compounds from the flowers extract and evaluation of anti-inflammatory activity	38
4. Acknowledgements.....	39
5. References.....	40

V. ÉTAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX.....	46
5.1 Introduction.....	47
5.2 Préparation des espèces végétales.....	48
5.3 Résultats et discussion.....	49
5.3.1 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	49
5.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante.....	50
5.3.3 Évaluation de l'activité anticancéreuse.....	51
5.4 Résultats.....	52
5.5 Conclusion.....	55
 VI. CONCLUSION.....	 56
 VII. BIBLIOGRAPHIE.....	 59
 VIII. ANNEXES.....	 65

LISTE DES FIGURES

Figure 1. <i>Solidago canadensis</i> L.....	9
Figure 2. Distribution du <i>Solidago canadensis</i> L. en Amérique du Nord.....	10
Figure 3. Structures des principaux constituants de l'huile essentielle de <i>Solidago canadensis</i>	13
Figure 4. Structures d'acides phénoliques présents dans le <i>Solidago canadensis</i>	14
Figure 5. Structures de flavonoïdes provenant du <i>Solidago canadensis</i>	15
Figure 6. Structures de diterpènes retrouvés dans le <i>Solidago canadensis</i>	16
Figure 7. Structures de diterpènes de type clérodane et de triterpènes de type lupane issus du <i>Solidago canadensis</i>	17
Figure 8. Structure de la génine des saponines isolées à partir du <i>Solidago canadensis</i>	18
Figure 10. Structures des esters retrouvés dans le <i>Solidago canadensis</i>	18
Figure 11. Structures des hydrocarbures et de l'époxide de caryophyllène provenant du <i>Solidago canadensis</i>	18
Figure 12. Structures de composés terpéniques isolés dans le <i>Solidago canadensis</i>	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Usages ethnopharmacologiques du <i>Solidago canadensis</i> en Amérique du Nord.....	12
Tableau 2. Données relatives à la récolte des espèces sélectionnées.....	48
Tableau 3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'espèces de la forêt boréale.....	52
Tableau 4. Évaluation de l'activité antioxydante d'espèces de la forêt boréale.....	53
Tableau 5. Évaluation de l'activité anticancéreuse d'espèces de la forêt boréale.....	54

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. SPECTRE DE MASSE DU SOLICANOLIDE.....	66
ANNEXE 2. SPECTRES RMN DU SOLICANOLIDE.....	68
ANNEXE 3. LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	74

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1. Introduction

1.1 Problématique

La forêt boréale est considérée comme l'un des plus vastes écosystèmes forestiers de la planète. Elle est surtout constituée de conifères et forme une bande ceinturant l'hémisphère Nord sur une largeur de plusieurs milliers de kilomètres. On la retrouve principalement au Canada, mais aussi en Russie et dans les pays scandinaves. Au Québec, elle couvre plus de 550 000 km², soit près de 70% du territoire forestier (Bryant et al, 1997). C'est un écosystème dynamique qui constitue à la fois un habitat pour la faune et la flore, un milieu de vie pour plusieurs communautés humaines et un réservoir de ressources naturelles renouvelables importantes.

En 2005, le gouvernement du Québec amorçait un véritable virage forestier en effectuant des modifications à la Loi sur les forêts. Des changements essentiels pour assurer la pérennité de la ressource forestière fondés sur le développement durable des régions. Une vision à long terme et une approche de prudence. Cependant, avec une réduction de 20% de la possibilité forestière pour les années 2005 à 2008, l'économie et le développement des régions sont particulièrement touchés (Ministère des ressources naturelles et de la faune, 2008). Ainsi, les régions tentent de diversifier l'exploitation de leurs forêts par le développement de nouveaux produits. Les produits ou sous-produits issus d'espèces

végétales indigènes ou naturalisées autre que la matière ligneuse destinée à l'industrie du bois d'œuvre, de la pâte et papier, du bois de chauffage ou du charbon sont désignés comme étant des produits forestiers non ligneux (PFNL). Ces bioproduits constituent un outil pour la mise en place de communautés vivant de la forêt. Les PNFL sont une source d'emplois dans divers secteurs. Ils impliquent l'expertise et la culture locale et augmentent ainsi les retombées économiques par la diversification des produits de la forêt. Les PFNL sont utilisés au niveau alimentaire, cosmétique, ornemental, nutraceutique et pharmaceutique (Ministère des affaires municipales et des régions, 2007).

Autrefois, beaucoup d'espèces végétales étaient utilisées par les amérindiens pour traiter divers maux (Moerman, 1998). Cependant, peu d'études scientifiques ont porté sur l'efficacité réelle de ces plantes. En 2000, le nombre de médicaments sous ordonnance d'origine naturelle était évalué à 50%. À ce jour, on estime à seulement 10% les espèces végétales qui auraient été étudiés pour leurs activités biologiques au niveau mondial. (Harvey, 2000).

L'asthme est la maladie respiratoire la plus importante au Canada. Au Québec, on estime à 700 000 le nombre de personnes qui souffrent d'asthme dont 300 000 enfants (Association pulmonaire du Québec, 2008). Même si les symptômes de cette maladie chronique peuvent être réduits en partie par un traitement adéquat, ceux-ci sont encore responsables d'une diminution importante de la qualité de vie. De plus, l'asthme est la cause d'une utilisation importante des soins de santé en milieu hospitalier imposant ainsi un

fardeau important pour la société. Chaque année au Québec, l'asthme occasionne plus de 760 000 visites chez le médecin, environ 100 000 visites à l'urgence, 56 000 jours d'hospitalisation, 3235 journées de travail perdues, 4 000 appels pour des services ambulanciers et malheureusement près de 150 décès. On estime que l'asthme entraîne des coûts de plus de 150 millions de dollars chaque année pour le système de santé au Québec (Laberge et al., 2000).

L'asthme est une affection caractérisée par des symptômes paroxystiques ou persistants comme la dyspnée, l'oppression thoracique, la respiration sifflante, la production de mucus et la toux. Ces symptômes sont associés à une obstruction bronchique variable et à une hypersensibilité des voies aériennes à divers stimuli endogènes ou exogènes (Lemanske et Busse, 2003). L'inflammation et ses effets sur la structure des voies aériennes semblent être responsables des principaux mécanismes qui provoquent l'apparition et la persistance de l'asthme (Boulet et al., 1999). Dans des conditions normales, l'inflammation est un processus structuré issu des mécanismes de défense naturels. Son rôle est d'éliminer l'agent agresseur, de bloquer l'atteinte tissulaire et de rétablir l'homéostasie et la fonction du tissu (Lemanske et Busse, 2003). Cependant, il arrive que l'équilibre homéostatique soit rompu et qu'une anarchie dans le mécanisme de réparation provoque une chronicité de l'inflammation et par le fait même, une altération du fonctionnement des tissus. Les causes biologiques de ces dysfonctions font l'objet de plusieurs recherches, mais elles demeurent tout de même, peu connues. Jusqu'à maintenant, peu d'études cliniques visant le développement de thérapies pour l'asthme allergique ont eu pour cible les macrophages

bronchiques. Les médiateurs de l'inflammation sont des substances naturelles présentes dans l'organisme qui déclenchent ou activent la réaction inflammatoire. Les cytokines sont des substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction (Gosset et al., 1998). L'identification de composés d'origine naturelle issus de la forêt boréale ayant un effet sur la libération des médiateurs et des cytokines des macrophages pourrait permettre de bloquer le processus inflammatoire, freiner la dégradation de la muqueuse bronchique et les symptômes relatifs à l'asthme. De tels composés pourraient permettre de traiter les asthmatiques qui ne répondent pas aux traitements classiques (corticothérapie). D'autre part, ils pourraient également être utiles pour traiter d'autres maladies impliquant un processus inflammatoire comme l'arthrite et certaines maladies de l'intestin comme la maladie de Crohn.

1.2 Objectifs

Plusieurs espèces de la forêt boréale étaient utilisées pour des applications anti-inflammatoires par les peuples ancestraux d'Amérique du Nord. Ces espèces incluent *Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Ledum groenlandicum*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pinus banksiana*, *Populus balsamifera*, *Populus tremuloides*, *Solidago canadensis*, *Vaccinium angustifolium* et *Vaccinium myrtilloides* (Moerman, 2000).

L'objectif principal de ce projet de recherche visait à valoriser la biomasse de la forêt boréale notamment par l'étude du potentiel anti-inflammatoire d'extraits et de composés issus de la forêt boréale. Les objectifs spécifiques de ce travail de recherche étaient de sélectionner plusieurs plantes potentiellement anti-inflammatoires de la forêt boréale en se basant sur la médecine traditionnelle amérindienne. Extraire les différentes parties (fleurs, feuilles, tiges et racines) des plantes sélectionnées. Évaluer les activités anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse des différents extraits. Sélectionner l'extrait le plus actif, isoler les composés responsables de l'activité par diverses méthodes chromatographiques et identifier les composés isolés par des analyses structurales et spectroscopiques.

Des travaux préliminaires ont été réalisés sur plusieurs extraits méthanoliques de plantes potentiellement anti-inflammatoires afin de sélectionner le plus actif. Les résultats obtenus ont démontré que le *Solidago canadensis* était l'espèce la plus active. Celle-ci a donc été étudiée dans le but d'identifier les composés actifs. Par la même occasion, les activités antioxydante et anticancéreuse de plusieurs extraits de plantes ont été évaluées dans le cadre de ce projet de maîtrise.

1.3 Structure du mémoire

Ce mémoire est divisé en huit chapitres. Le premier chapitre présente la problématique ainsi que les objectifs du projet de recherche. Le chapitre II est une revue de littérature scientifique à propos de la botanique, des usages, de la phytochimie et de la pharmacologie du *Solidago canadensis*. Le chapitre III rapporte l'évaluation de l'activité anticancéreuse de composés isolés à partir des fleurs de *Solidago canadensis* et l'isolation d'un nouveau diterpène de la famille des labdanes. Ces travaux ont été publiés dans *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Bradette-Hébert, M.E., Legault, J., Lavoie, S., Pichette, A., 2008. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 56, 82-84). Le chapitre IV présente les résultats sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de fleurs, de feuilles et de tiges de *Solidago canadensis*. Les chapitres V à VIII rapportent respectivement l'état d'avancement du projet, les conclusions et perspectives, la bibliographie et les annexes.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE : *Solidago canadensis* Linné

2. Revue de littérature : *Solidago canadensis* Linné

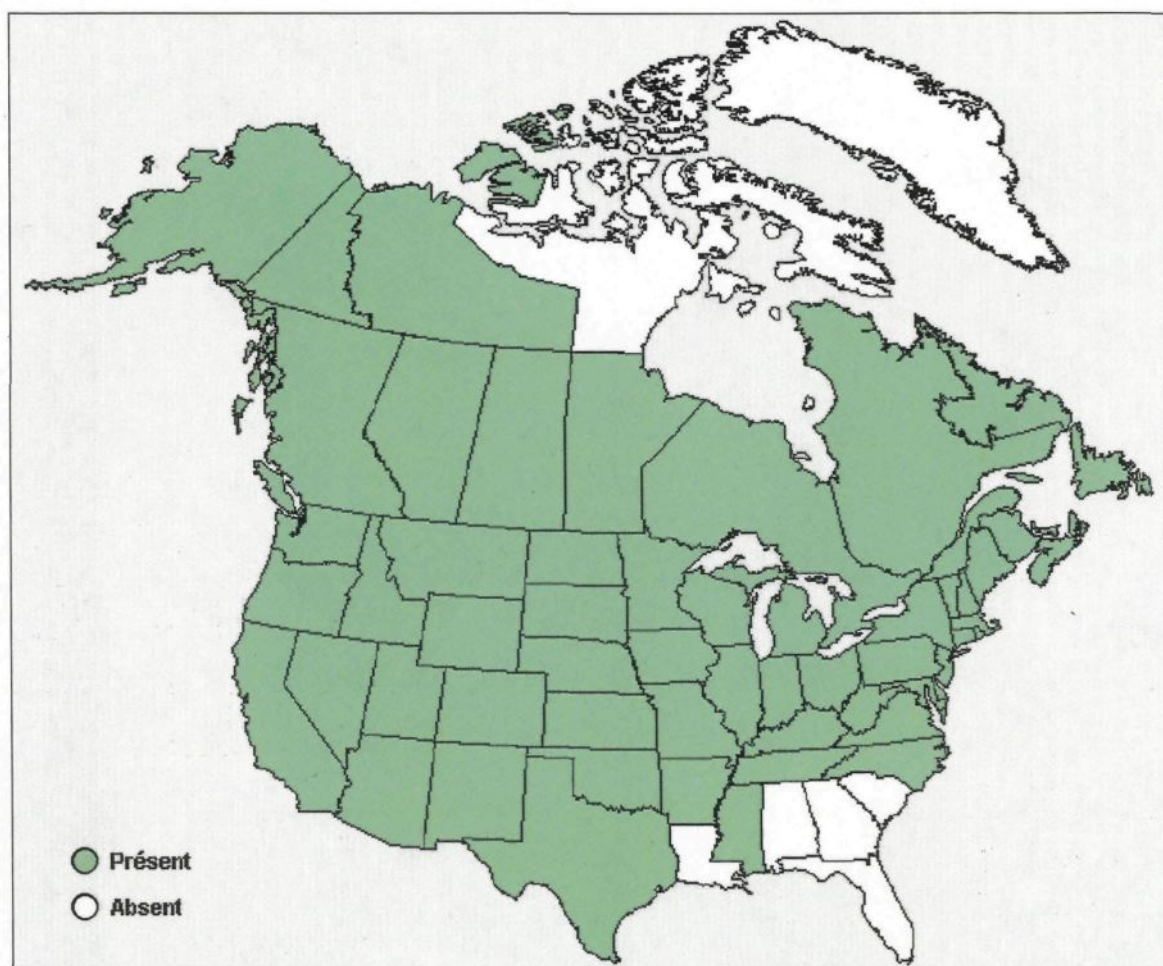
2.1 Botanique

Le genre *Solidago* comprend environ 125 espèces presque toutes nord-américaines et fait partie de la famille des Astéracées. Le *Solidago canadensis*, aussi connu sous le nom de verge d'or du Canada, est une plante herbacée vivace indigène du Canada (Figure 1) (Marie-Victorin, 1995).



Figure 1. *Solidago canadensis* L.

Le *Solidago canadensis* L. est pour ainsi dire présent partout en Amérique du Nord et il est naturalisé en Europe (Boufford, 1993).



Source : <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SOCA6>: Natural resources conservation service, United States department of agriculture. Dernière mise à jour : 27-03-2007

Figure 2. Distribution du *Solidago canadensis* L. en Amérique du Nord

La verge d'or du Canada possède une tige grêle d'environ 30 à 150 cm de hauteur. Ses feuilles sont minces, alternées, linéaires, pointues et trinervées. Ses capitules d'une couleur jaune sont très petits (2 à 2.8 mm de hauteur) et nombreux. L'inflorescence apparaît en panicule pyramidale et les capitules sont unilatéralement disposés sur les branches de la grappe. Cette espèce amorce sa floraison en période estivale et celle-ci persiste jusqu'à l'automne (Marie-Victorin, 1995). La verge d'or du Canada forme des colonies très denses qui sont favorisées par une reproduction par graines et par rhizomes qui leur assurent une expansion prolifique. Cette espèce s'acclimate facilement à des sols de types variés et on la retrouve dans des écosystèmes différents. Elle est d'ailleurs considérée comme une plante envahissante dans les zones humides, les lieux incultes, les clairières et les prairies humides. Elle fait concurrence aux autres espèces en couvrant le sol et en étouffant la végétation environnante (Weber, 1998).

2.2 Usages

Le *Solidago canadensis* est reconnu pour ses usages en médecine traditionnelle amérindienne (Tableau 1). D'ailleurs, l'utilisation de cette plante pour des applications liées à la douleur et l'inflammation est rapportée pour différents peuples ancestraux.

Tableau 1. Usages ethnopharmacologiques du *Solidago canadensis* en Amérique du Nord

Traitement	Partie de la plante	Forme	Peuple ancestral
Analgésique	Fleurs et racines	Infusion	Iroquois
Morsures de serpent	Racines	Mastication	Iroquois
Brûlures	Fleurs	Compresse humide	Ojibwa (Chippewa)
Ulcères	Fleurs	Compresse humide	Ojibwa (Chippewa)
Analgésique	Fleurs	Infusion	Zuni
Troubles gastro-intestinaux	Fleurs	Infusion	Iroquois
Troubles du foie	Fleurs	Infusion	Iroquois
Sédatif	Racines	Infusion	Iroquois
Émétique	Fleurs et racines	Infusion	Iroquois
Diarrhée	Fleurs	Infusion	Okanagan-colville
Diarrhée	Fleurs et pousses	Décoction	Thompson
Sédatif	Plante entière	Décoction	Thompson
Fièvre	Non spécifié	Infusion	Algonquin

Source : Moerman, D.E., "Native American ethnobotany", Third edition, Ed. Timber Press Inc., Portland, United States, 2000, pp. 536.

2.3 Phytochimie

Plusieurs espèces issues du genre *Solidago* comme le *Solidago virgaurea*, le *Solidago gigantea* et le *Solidago graminifolia* sont reconnues pour leur contenu fortement élevé en métabolites secondaires variés. En effet, différents composés phénoliques, plusieurs flavonoïdes, polysaccharides, diterpènes, triterpènes, saponosides, tannins et composés volatils ont été rapportés pour ce genre (Kalembe, 1994; Thiem et al., 2001).

D'abord, une étude exhaustive de l'huile essentielle de *Solidago canadensis* a mené à l'identification de 51 composés volatils. Ces travaux montrent que l'huile essentielle est principalement composée d' α -pinène (1), de germacrène D (2) et de limonène (3) avec des concentrations relatives de 59.5%, 15.2% et 9.7% (Kalembe et Thiem, 2004).

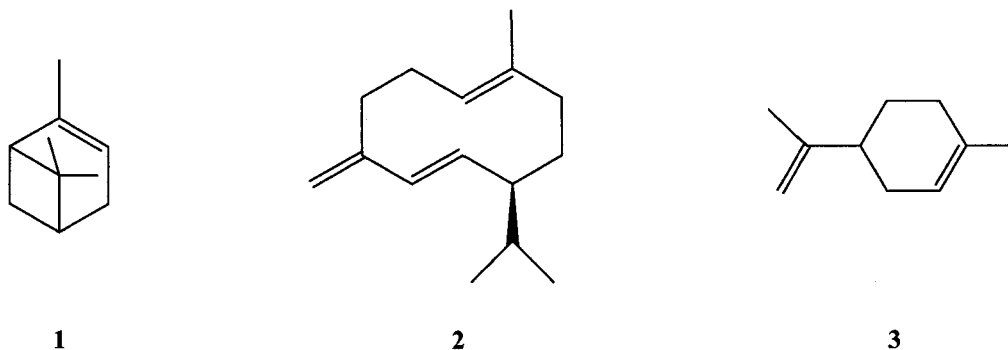


Figure 3. Structures des principaux constituants de l'huile essentielle de *Solidago canadensis*.

D'autre part, plusieurs composés phénoliques ont également été identifiés dans la verge d'or du Canada. Des travaux ont mené à l'isolation de plusieurs acides phénoliques incluant les acides caféique (4), salicylique (5), p-hydroxybenzoïque, vanillique (6), protocatechuique (7), syringique (8), ferulique (9), p-coumarique (10), sinapique (11), chlorogénique (12), néochlorogénique (13), 3,5-di-O-caffeoylquinique (14), 4,5-di-O-caffeoylquinique (15) et un dérivé de l'acide dattelique (Kalemba, 1992; Pauli et al., 1998; Thiem et al., 2001; Apáti et al., 2002; Apáti et al., 2003; Papp et al., 2004).

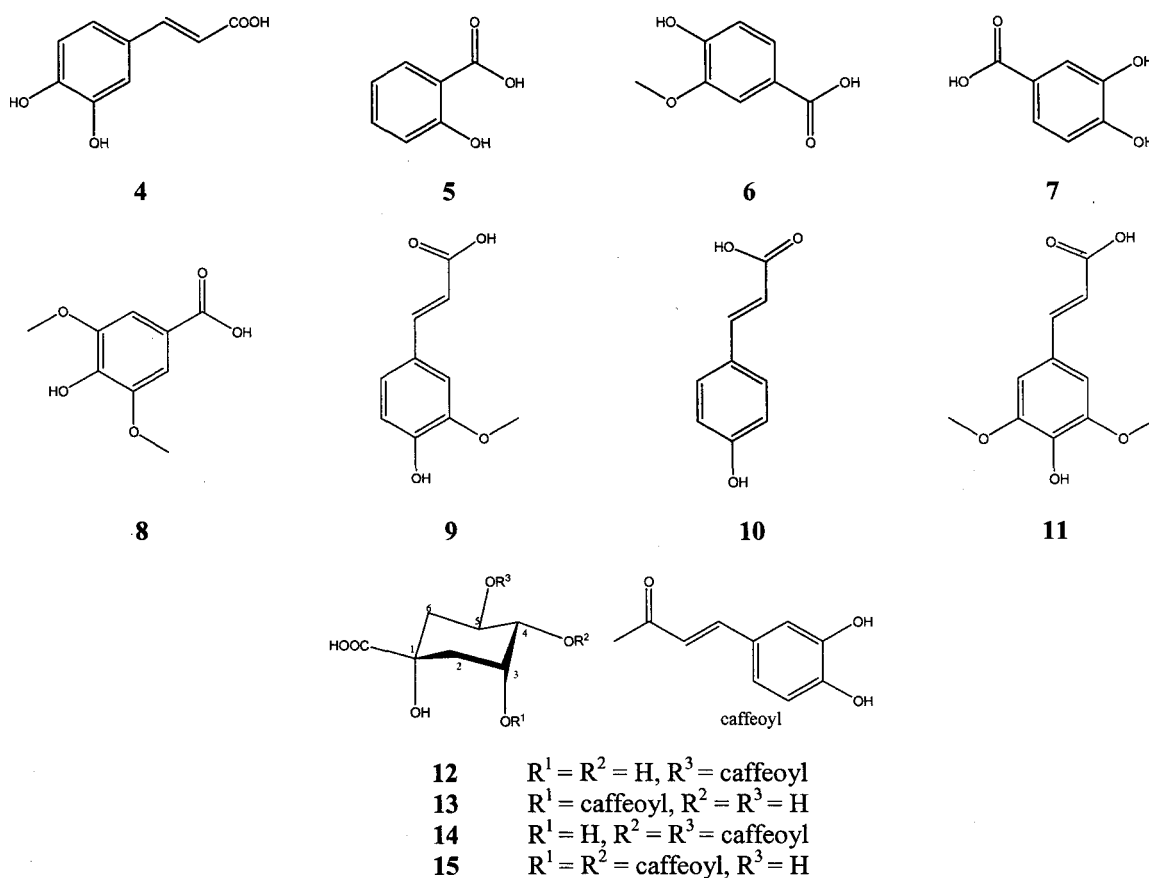


Figure 4. Structures d'acides phénoliques présents dans le *Solidago canadensis*.

Plusieurs flavonoïdes ont été rapportés dans des extraits de *Solidago canadensis* incluant : la nicotiflorine (16), la rutine, l'hyperoside, l'isoquercitrin, le quercitrin, l'afzeline (17), la quercétine (18), la quercétine-3-(6''-O-acetyl)- β -glucopyranoside, le kaempférol (19), l'astragaline, le kaempférol-3-(6''-O-acetyl)- β -glucopyranoside, l'isorhamnétine (20), l'isorhamnétin-3-(6''-O-acetyl)- β -glucopyranoside et le narcissin (Krepinsky et Herout, 1962; Apáti et al., 2002; Apáti et al., 2003; Papp et al., 2004).

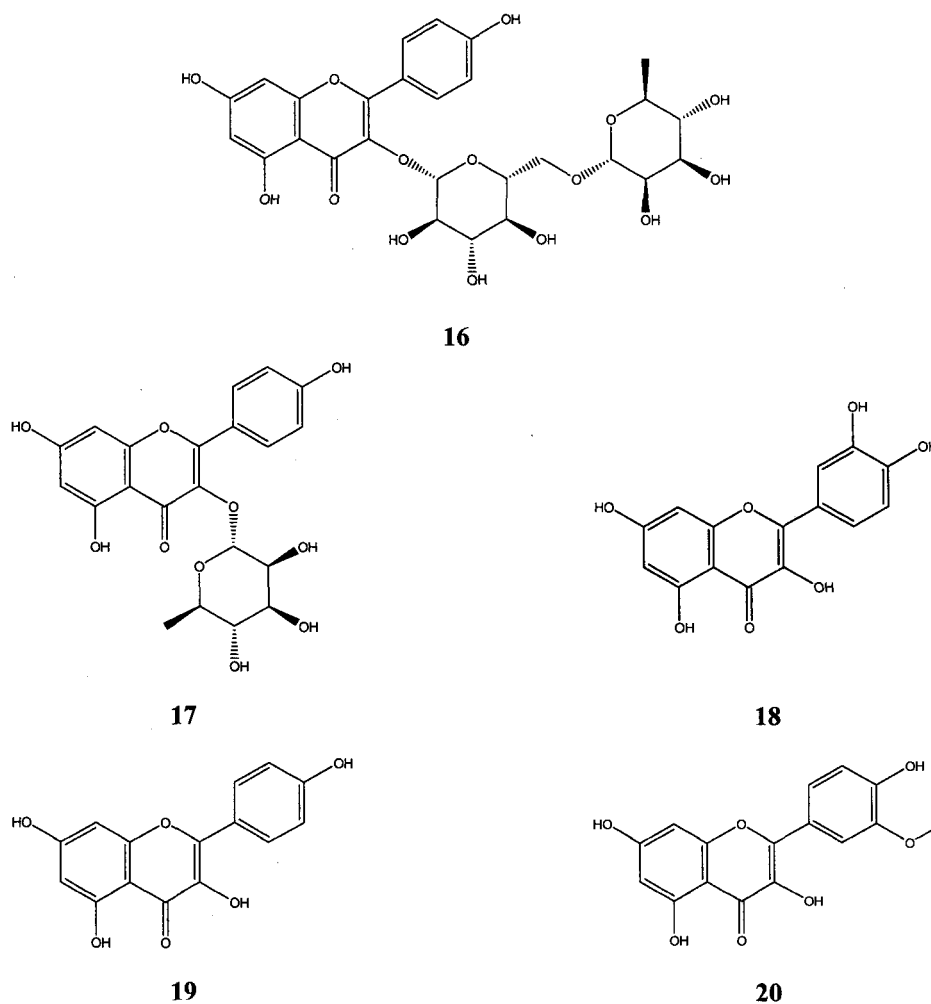


Figure 5. Structures de flavonoïdes provenant du *Solidago canadensis*.

Des études portant sur des extraits de *Solidago canadensis* ont également mené à l'isolation du diterpène **21**. De plus, la présence des labdanes **22-24** a été rapportée (Anthonsen et al., 1969; Bohlmann et al., 1980). La solidagénone (**25**) est le diterpène majoritaire de la verge d'or du Canada (Anthonsen et al., 1969; Anthonsen et al., 1970). Les diterpènes de type clérodane **26-32**, dont l'acide kolavénique (**26**), ont aussi été identifiés (Lu et al., 1993) et quelques triterpènes de type lupane ont été isolés: le 3 β -(3R-acétoxyhexadécanoyloxy)-lup-20(29)-ène (**33**), le 3 β -(3-kétohexadécanoyloxy)-lup-20(29)-ène (**34**), le 3 β -(3R-acétoxyhexadécanoyloxy)-29-nor-lupan-20-one (**35**) et le 3 β -(3-kétohexadécanoyloxy)-29-nor-lupan-20-one (**36**) (Chaturvedula et al., 2004).

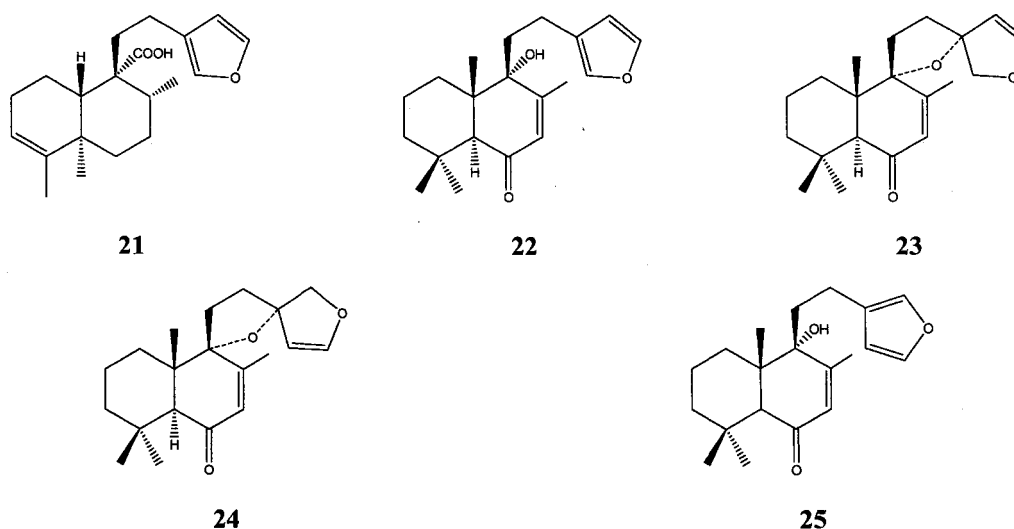


Figure 6. Structures de diterpènes retrouvés dans le *Solidago canadensis*.

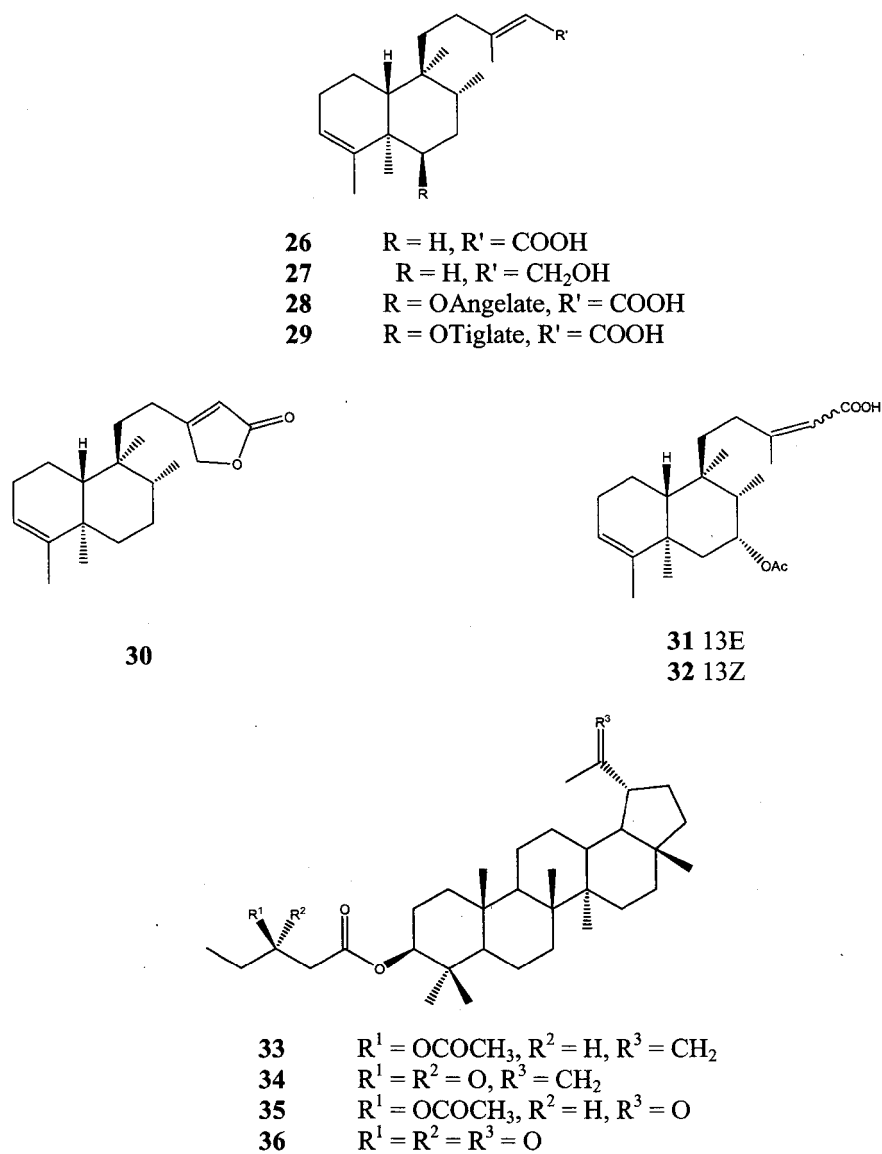
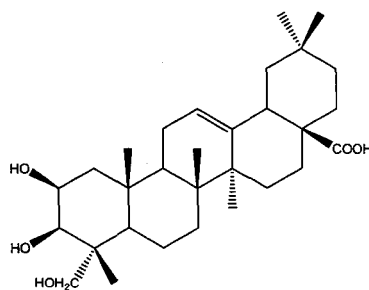


Figure 7. Structures de diterpènes de type clérodane et de triterpènes de type lupane issus du *Solidago canadensis*.

Par ailleurs, des travaux portant sur le *Solidago canadensis* ont conduit à la découverte de saponines de type bisdesmosidique (Reznieck et al., 1990; Reznieck et al., 1991; Reznieck et al., 1992). La génine (37) de ces saponines est illustrée à la figure 7.



37

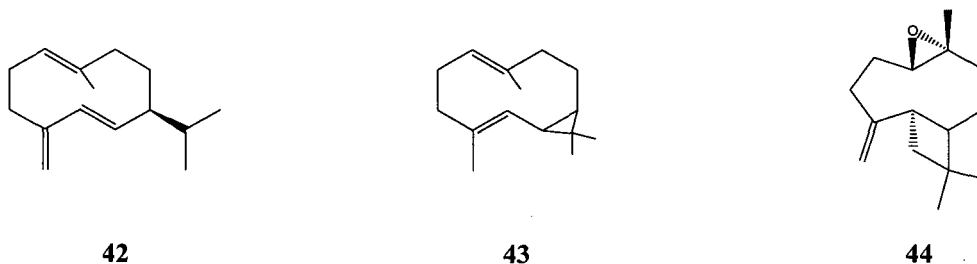
Figure 8. Structure de la génine des saponines isolées à partir du *Solidago canadensis*.

D'autres travaux de recherche portant sur le *Solidago canadensis* ont mené à l'isolation des esters de type matricaria 38-41 (Lu et al., 1998), des sesquiterpènes 42 et 43 et de l'époxyde de caryophyllène 44 (Bohlmann et al., 1980).



38	2Z, 8Z	R = O-Tiglate
39	2Z, 8Z	R = O-Angelate
40	2E, 8Z	R = O-Angelate
41	2Z, 8-dehydro	R = H

Figure 9. Structures des esters retrouvés dans le *Solidago canadensis*.



42

43

44

Figure 10. Structures des sesquiterpènes et de l'époxyde de caryophyllène provenant du *Solidago canadensis*.

Finalement, une étude a mené à l'isolation du lupéol (**45**), de l'acétate de lupeyle, de l'acide ursolique (**46**), du cycloarténol (**47**), du palmitate cycloartényl, de l'acétate d' α -amyrine et du stigmastérol (**48**) (Chaturvedula et al., 2004).

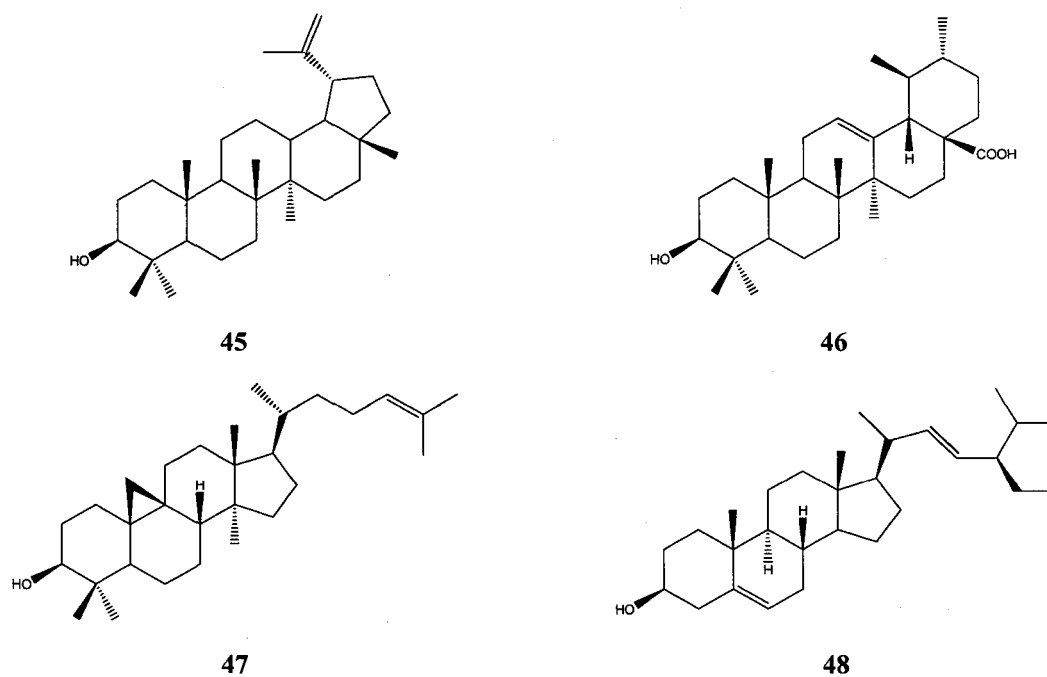


Figure 11. Structures de composés terpéniques isolés dans le *Solidago canadensis*.

2.4 Pharmacologie

Plusieurs activités au niveau biologique ont été rapportées dans la littérature pour le genre *Solidago*. Entre autres, les activités analgésique, anti-inflammatoire, antiphlogistique, antinéoplasique, immunobiologique et urologique pour le *Solidago virgaurea* (Metzner et al., 1984; Arens-Corell and Okpanyi, 1990; Gross et al., 2002; Melzig, 2004; Choi et al., 2005). Par ailleurs, des activités au niveau anti-inflammatoire, diurétique et spasmolytique ont été rapportées pour le *Solidago gigantea* (Leuschner, 1995).

En ce qui concerne le *Solidago canadensis*, certains polyacétylènes provenant des fleurs ont inhibé la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Mycobacterium avium* (Lu et al., 1998). Un effet protecteur du système gastrique a été observé pour la solidagénone isolée à partir de rhizomes de *Solidago canadensis* (Schmeda-Hirschmann et al., 2002). Plusieurs composés provenant des tiges et des racines dont des triterpènes de la famille des lupanes ont inhibé l'activité lyase de l'ADN polymérase β (Chaturvedula et al., 2004). Enfin, le potentiel antioxydant est l'activité biologique ayant suscité le plus d'intérêt chez le *Solidago canadensis*. En effet, il a été démontré que des extraits de la plante entière possèdent une activité anti-radicalaire et antioxydante (Apáti et al., 2003; Papp et al., 2004). De plus, un extrait de racines a montré un pouvoir anti-radicalaire (McCune and Johns, 2002).

CHAPITRE III

A New Labdane Diterpene from the Flowers of *Solidago canadensis*

Article publié dans *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56 (1), 82-84, 2008.

Résumé

Le *Solidago canadensis* L. est une plante herbacée de la famille des Astéracées. En Amérique du Nord, les fleurs de cette plante étaient fréquemment utilisées en médecine traditionnelle amérindienne. Dans le but de valoriser la biomasse de la forêt boréale par l'étude de l'activité biologique de composés d'origine naturelle, un extrait de fleurs de *Solidago canadensis* a été étudié. Un nouveau diterpène de type labdane, le 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadièn-15,16-olide (solicanolide, **1**) et six composés connus : la quercétine (**2**), l'acide 3-*O*-caffeoylquinique (**3**, acide néochlorogénique), l'acide 5-*O*-caffeoylquinique (**4**, acide chlorogénique), l'acide 4,5-di-*O*-caffeoylquinique (**5**), l'acide 3,5-di-*O*-caffeoylquinique (**6**) et l'acide 3,4-di-*O*-caffeoylquinique (**7**) ont été isolés. Le composé **7** (acide 3,4-di-*O*-caffeoylquinique) est rapporté pour la première fois à partir du *Solidago canadensis*. Cet article décrit l'isolation des composés **1-7** et l'élucidation de la structure du nouveau composé (**1**). L'évaluation de l'activité anticancéreuse de tous les composés isolés est décrite. Parmi tous les composés isolés, seul le composé **1** possède une activité cytotoxique.

A New Labdane Diterpene from the Flowers of *Solidago canadensis*

Marie-Eve BRADETTE-HÉBERT, Jean LEGAULT, Serge LAVOIE, and André PICHETTE*

LASEVE, Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boul. Université, Chicoutimi, Québec, G7H 2B1, Canada. Received June 28, 2007; accepted September 25, 2007

A new labdane diterpene, 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadien-15,16-olide (solicanolide, **1**) and six known compounds identified as quercetin (**2**), 3-*O*-caffeoylquinic acid (3, neochlorogenic acid), 5-*O*-caffeoylquinic acid (4, chlorogenic acid), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**5**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**6**) and 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (**7**) were isolated from the flowers of *Solidago canadensis*. To our knowledge, compound **7** was isolated for the first time in *S. canadensis*. This work describes the isolation of compounds **1**–**7** and the structure elucidation of a new compound identified as compound **1**. Solicanolide (**1**) showed cytotoxic activity against A549 (IC₅₀: 13 \pm 2 μ M), DL-D-1 (IC₅₀: 26 \pm 2 μ M) and WS1 (IC₅₀: 17 \pm 1 μ M) cell lines.

Key words *Solidago canadensis*; isolation; labdane; solicanolide; cytotoxicity; caffeoylquinic acid

Solidago canadensis L. is an Asteraceae widely distributed across North America, occurring in almost every state of the U.S.A. and throughout Canada. Numerous interesting secondary metabolites such as: flavonoids, phenolic acids and glucosides, polysaccharides, diterpenes, triterpenoid saponosides, tannins and essential oils¹ were reported for the genus *Solidago*. Previous phytochemical studies of *S. canadensis* have led to the isolation of flavonoids,^{2,3} phenolic acids,⁴ sesquiterpenes,⁵ diterpenes^{6,7} and saponins.⁷ The flowers of *S. canadensis* were used in traditional Amerindian medicine as an analgesic,⁸ burns and ulcers treatment,⁹ febrifuge,¹⁰ gastrointestinal^{11,12} and liver¹¹ aids. In spite of the widespread use of *S. canadensis*, few investigations were carried out on its bioactive secondary metabolites.

Fractionation of the flower extracts of *Solidago canadensis* resulted in the isolation of a new diterpene, 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadien-15,16-olide (solicanolide, **1**) and six known compounds identified as quercetin (**2**), 3-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) (**3**), 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) (**4**), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**5**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**6**) and 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (**7**). To our knowledge, compound **7** was isolated for the first time in *S. canadensis*. This work describes the isolation of compounds **1**–**7** and the structure elucidation of a new compound identified as compound **1**. The cytotoxicity of solicanolide (**1**) was also investigated in this paper.

Experimental

General Experimental Procedures NMR spectra were recorded in methanol-*d*₄ on a Bruker Avance 400 spectrometer (5 mm QNP with Z-gradient probe) operating at 400.13 MHz (¹H) or 100.61 MHz (¹³C). Chemical shifts were referenced relative to the corresponding residual solvent signals (δ_{H} : 3.31/49.0 ppm, respectively). The accurate mass determination was carried out with an Applied Biosystems QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS system. Optical rotation was obtained on a Jasco DIP-360 digital polarimeter. Analytical HPLC-DAD-MS analysis were performed on an Agilent 1100 series HPLC-DAD-MS system. A Zorbax ODS C18 column (5 μ m, 150 \times 4.6 mm) maintained at 25 $^{\circ}$ C was utilised. The flow rate was 1 ml/min. Agilent G1315B diode array detector was used for UV detection. The UV spectra were recorded from 190 to 400 nm. An Agilent mass selective detector (VL model) equipped with an atmospheric chemical ionisation source (APCI) was employed for MS detection. All mass spectra were acquired in the negative ion mode. The full scan mass spectrum was recorded over the range of *m/z* 100–1000. Temperature of the drying gas (N₂) was 350 $^{\circ}$ C with a gas flow rate of 10 l/min and a nebulizing pressure of 40 psi. The ionisation voltage was 4000 V and the corona current was 15 mA. All HPLC

separations were performed on a preparative Agilent 1100 series (Agilent Technologies Canada Inc.) with a ZORBAX ODS column C18 (2.1 \times 25 cm; 7 μ m) at a flow rate of 16 ml/min. Compounds were detected by UV absorption at 254 nm. For all HPLC procedures, solvent A was H₂O+0.1% HCOOH, solvent B was MeOH+0.1% HCOOH and solvent C was ACN+0.1% HCOOH. Silica gel 60 (230–400 mesh, Silicycle), Diaion HP-20 (Supelco) and C18 silica gel (230–400 mesh, EMD) were used for column chromatography. The solvents were purchased from EMD. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets (Silicycle) using EtOAc–MeOH–H₂O (100:16.5:13.5) or CHCl₃–MeOH (10:1) as solvent systems. Detection of the phenolic compounds was carried out by spraying natural products with NP/PEG reagent (1%

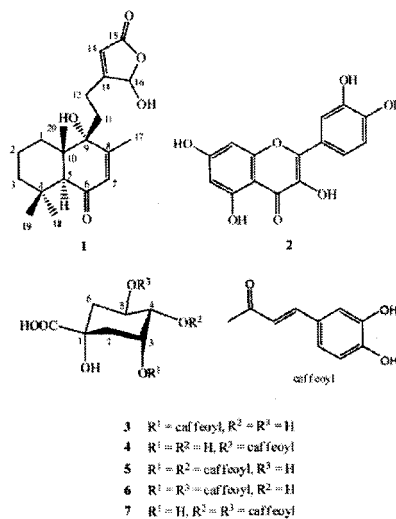


Fig. 1. Structures of Compounds **1**–**7**

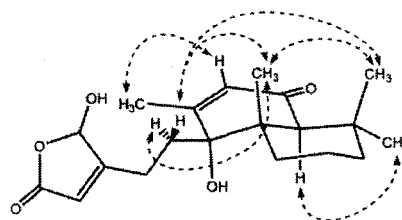


Fig. 2. ¹H–¹H NOESY Correlations of Compound **1**

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: andre_pichette@uqac.ca

diphenylboric acid 2-aminoethyl ester in methanol and 5% polyethylene glycol in ethanol) and observing under UV light before and after revelation (254, 365 nm). Quercetin and chlorogenic acid standards are from Sigma-Aldrich.

Plant Material The flowers of *Solidago canadensis* L. were collected in September 2004 in St-Félicien (48°40'N, 72°27'W), Québec, Canada. The specimens were identified by Mr. Patrick Nadeau (Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Québec, Canada). A voucher specimen was deposited in the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec, Canada (QFA-492115).

Extraction and Isolation The air-dried flowers of *Solidago canadensis* (285 g) were extracted with hot methanol (3×2.5 l) and then with hot methanol 80% (3×2.5 l) for 2 h. The combined extracts were evaporated under a reduced pressure, yielding a residue (103.81 g), which was suspended in water (400 ml) and successively extracted with dichloromethane (3×200 ml) and ethyl acetate (6×400 ml), yielding dichloromethane, ethyl acetate and aqueous fractions.

The ethyl acetate fraction (15.6 g) was separated into two fractions (A, B) by chromatography over Diaion (3.2×40.5 cm) eluting with MeOH-H₂O (from 50 to 100%). Fraction B (3.0 g) was chromatographed on a silica gel column (3.6×120.0 cm) with CHCl₃-MeOH (10:1) to obtain six fractions (B1-B6). From B1 (91.4 mg), compound 1 (5.4 mg) was purified by preparative HPLC (40% solvent A, 60% solvent B). Fractions B5 and B6 were combined and then fractionated on a silica gel column (3.0×45.0 cm) with CHCl₃-MeOH (10:1) to give compound 2 (53.6 mg).

The aqueous fraction (66.13 g) was separated into three fractions (C, D, E) by chromatography on a silica gel column (7.0×60.0 cm) using an isocratic solvent system of EtOAc-MeOH-H₂O (100:16.5:13.5). Fraction D (6.70 g), which contained the major constituents, was divided into six fractions (D1-D6) using Diaion (3.2×40.5 cm) by elution with MeOH 20%. Fraction D2 (1.03 g) was separated into nine fractions (D2A-D2I) by chromatography on a C18 silica gel column (1.6×46.0 cm) and eluted with MeOH 10%. From D2A (214.2 mg), compounds 3 (3.8 mg) and 4 (9.3 mg) were purified by preparative HPLC (94% solvent A, 6% solvent C). Fractions D2E (135.1 mg) and D2F (64.9 mg) were combined and then, fractionated by preparative HPLC (84% solvent A, 16% solvent C) to yield compounds 5 (9.1 mg), 6 (7.0 mg) and 7 (11.4 mg).

Solicanolide (1): Yellow oil; $[\alpha]_D^{25} -30.1^\circ$ ($c=0.1$, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) 216 nm; HR-ESI-MS m/z 371.1834 [M+Na]⁺ (Calcd for C₂₀H₂₈O₅Na, 371.1842); ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 1.

Cell Culture The human lung carcinoma A549 (#CCL-185), colorectal adenocarcinoma DLD-1 (#CCL-221) and skin fibroblast WS1 (#CRL-1502) cell lines were all obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, U.S.A.). Cells lines were grown in minimum essential medium containing Earle's salts (Mediatech Cellgro®, Herndon, U.S.A.), supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, U.S.A.), 1× solution of vitamins, 1× sodium pyruvate, 1× non-essential amino acids, 100 IU of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cytotoxic Assay Exponentially growing cells were plated at a density of 5×10³ cells per well in 96-well microplates (BD Falcon) in 100 µl of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. The cells were then incubated for 48 h in the presence or absence of 100 µl of increasing concentrations of compounds 1-7 dissolved in culture medium and an appropriate solvent. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.25% (v/v) to avoid toxicity. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test.¹² Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration of drug inhibiting cell growth by 50% (IC₅₀).

Results and Discussion

Compound 1 was obtained as an optical active yellow oil ($[\alpha]_D^{25} -30.1^\circ$). The molecular formula of compound 1 was established as C₂₀H₂₈O₅ on the basis of HR-ESI-MS (Found at m/z 371.1834 [M+Na]⁺, Calcd for C₂₀H₂₈O₅Na, 371.1842). ¹H-, ¹³C-NMR and DEPT spectra revealed four methyls, five methylenes, four methines including two olefinics and seven quaternary carbons including a carbonyl and a quaternary alcohol (Table 1). The NMR spectra sug-

Table 1. NMR Assignments of Compound 1

Position	¹³ C ^a	Connected ¹ H ^b	H-H COSY ^c	HMBC ^d	NOESY ^e
1	32.6 (t)	1.92 (m), 1.57 (m)		H5, 20	
2	19.0 (t)	1.66 (m), 1.53 (m)	H3		
3	43.9 (t)	1.35 (m), 1.19 (m)	H2	H18, 19	
4	33.3 (s)	—		H5, 18, 19	
5	56.8 (d)	2.88 (s)	H20	H18, 19, 20	H18
6	202.9 (s)	—		H5	
7	129.6 (d)	5.66 (s)	H17	H17	H17
8	159.1 (s)	—		H17	
9	76.7 (s)	—		H5, 7, 17, 20	
10	48.1 (s)	—		H5, 20	
11	31.0 (t)	2.11 (m), 1.94 (m)			H14, 19, 20
12	25.4 (t)	2.65 (m)			
13	172.8 (s)	—			H14, 16
14	117.6 (d)	5.95 (s)		H16	H12, 14
15	173.7 (s)	—		H14, 16	
16	101.1 (d)	6.06 (s)		H14	H12
17	20.5 (q)	2.02 (s)	H7	H7	H7
18	34.3 (q)	1.14 (s)		H19	H5
19	22.2 (q)	1.18 (s)		H3, 5, 18	H11, 20
20	18.8 (q)	1.02 (s)	H5	H5	H11, 19

a) Multiplicities were determined by DEPT. b) Connections were determined by gHSQC. c) Determined by gCOSY. d) Correlation from C to the indicated protons. e) unambiguous NOESY cross peaks.

gests that compound 1 is a labdane diterpene.^(4,15)

HMBC correlations between H-17 (δ_H 2.02) and C-7, C-8, C-9 (δ_C 129.6, 159.1, 76.7 respectively) showed that the methyl group was branched β on an α,β -unsaturated ketone and that the quaternary alcohol group was on C-9. The position of the ketone was further confirmed by the HMBC correlation between H-5 (δ_H 2.88) and C-6 (δ_C 202.9). The side chain was identified as a γ -hydroxy- α,β -unsaturated- γ -lactone by the presence of typical⁽¹⁶⁾ ¹H (δ_H 5.95, 6.06) and ¹³C-NMR signals (δ_C 101.1, 117.6, 172.8, 173.7).

The relative stereochemistry of compound 1 was partially determined from the 2D NOESY spectrum. Cross-peaks between H-11 (δ_H 1.94, 2.11), H-19 (δ_H 1.18) and H-20 (δ_H 1.02) showed that all these groups are positioned on the same side. Unfortunately, NOESY correlations between H-16 (δ_H 6.06) and both H-11 (δ_H 1.94, 2.11) were observed with the same intensity which prevents the determination of the stereochemistry of the hydroxyl function at C-16. However, while some authors observed both epimers at H-16 of related compounds,^(17,18) its single signal in the ¹H- and ¹³C-NMR spectra suggests that only one epimer was isolated.

The determination of the absolute stereochemistry by the Mosher ester method was precluded by the limited amount of this natural product. However, the chemotaxonomic information indicated that all labdanes from *Solidago* genus belong to the normal series^(5,19,20) and by analogy, compound 1 could be assigned to this series. Therefore, the structure of compound 1 was identified as 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadien-15,16-olide.

The other compounds isolated were identified as quercetin (2), 3-*O*-caffeoylquinic acid (3, neochlorogenic acid), 5-*O*-caffeoylquinic acid (4, chlorogenic acid), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (5), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (6) and 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (7). Identification of these compounds was established by NMR (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC and HMBC) and HR-ESI-MS analyses. The data ob-

Table 2. Cytotoxic Activity of Isolated Compounds against A549 Lung Carcinoma Cells, DLD-1 Colon Carcinoma Cells and Normal Fibroblasts, WS1

Compound	IC ₅₀ (μM)		
	A549	DLD-1	WS1
Etoposide	1.1±0.1	4.8±0.8	n.d.
5-Fluorouracil	4.8±0.6	11±2	n.d.
1	13±2	26±2	17±1
2	>199	>199	>199
3	>57.5	>57.5	>57.5
4	>56	>56	>56
5	>109	>109	>109
6	>107	>107	>107
7	>36.8	>36.8	>36.8

Data are expressed as means±standard deviations of three determinations; n.d. = not determined.

tained were compared with those reported in the literature^{21,22} and standards. To our knowledge, this is the first report of the isolation of compound 7 from *Solidago canadensis*.

All isolated compounds were evaluated for their *in vitro* cytotoxic activity against human lung cancer A549, colon cancer DLD-1 and normal fibroblasts, WS1 cell lines. Etoposide and 5-fluorouracil was used as positive controls. As presented in Table 2, only compound 1 was found to be active against A549 (IC₅₀: 13±2 μM), DLD-1 (IC₅₀: 26±2 μM) and WS1 (IC₅₀: 17±1 μM) cell lines.

Acknowledgments The authors would like to thank Maxime Lebrun and Carole Grenon for technical assistance. This work was supported by the Fond Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) 02.

References

- Thiem B., Wesolowska M., Skrzypczak L., Budzianowski J., *Acta Pol. Pharm.*, **58**, 277–281 (2001).
- Apáti P., Szentmihályi K., Kristó Sz. T., Papp I., Vinkler P., Szoke É., Kéry Á., *J. Pharmaceut. Biomed.*, **32**, 1045–1053 (2003).
- Krepinsky J., Herout V., *Chem. Commun.*, **27**, 2459–2462 (1962).
- Kalembo D., *Pharmazie*, **47**, 471–472 (1992).
- Bohlmann F., Fritz U., King R. M., Robinson H., *Phytochemistry*, **19**, 2655–2661 (1980).
- Anthonsen T., McCabe P. H., McCrindle R., Murray R. D. H., *Tetrahedron*, **25**, 2233–2239 (1969).
- Reznicek G., Jurenitsch J., Kubelka W., Korhammer S., Haslinger E., Hiller K., *Planta Med.*, **56**, 554 (1990).
- Rousseau J., "Études ethnobotaniques québécoises: Le folklore botanique de Caughnawaga," Contributions de l'Institut botanique de l'Université de Montréal, **55**, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, 1945, pp. 7–72.
- Arnason T., Hebda R. J., Johns T., *Can. J. Bot.*, **59**, 2189–2325 (1981).
- Smith H. H., "Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians," Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee **7**, Milwaukee, United States, 1933, p. 53.
- Moerman D. E., "Native American Ethnobotany," 3rd ed., Timber Press Inc., Portland, United States, 2000, p. 536.
- Turner N. J., Bouchard R., Kennedy D. I. D., "Ethnobotany of the Okanagan-Colville Indians of British Columbia and Washington," British Columbia Provincial Museum, Occasional Paper Series, **21**, 1980, p. 84.
- O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F., *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5421–5426 (2000).
- Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J., Astudillo L., *J. Ethnopharmacol.*, **81**, 111–115 (2002).
- Rodriguez J. A., Theoduloz C., Sánchez M., Razmilic L., Schmeda-Hirschmann G., *Life Sci.*, **77**, 2193–2205 (2005).
- Chen C.-Y., Chang F.-R., Shih Y.-C., Hsieh T.-J., Chia T.-C., Tseng H.-Y., Chen H.-C., Chen S.-J., Hsu M.-C., Wu Y.-C., *J. Nat. Prod.*, **63**, 1475–1478 (2000).
- Zdero C., Bohlmann F., King R. M., *Phytochemistry*, **30**, 1591–1595 (1991).
- Scio E., Ribeiro A., Alves T. M. A., Romanha A. J., de Souza Filho J. D., Cordell G. A., Zani C. L., *Phytochemistry*, **64**, 1125–1131 (2003).
- Lu T., Vargas D., Franzblau S. G., Fischer N. H., *Phytochemistry*, **38**, 451–456 (1995).
- Vila R., Mundina M., Torri F., Furlán R., Zacchino S., Casanova J., Cañigueral S., *Planta Med.*, **68**, 164–167 (2002).
- Tatefuji T., Izumi N., Ohta T., Arsi S., Ikeda M., Kurimoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 966–970 (1996).
- Tolonen A., Joutsamo T., Mattila S., Kämäräinen T., Jalonen J., *Phytochem. Anal.*, **13**, 316–328 (2002).

CHAPITRE IV

Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts from *Solidago canadensis*

Article en préparation pour *Journal of Ethnopharmacology*.

Résumé

Le *Solidago canadensis* L. est une plante herbacée de la famille des Astéracées. En Amérique du Nord, cette plante était utilisée en médecine traditionnelle amérindienne pour traiter la douleur, les brûlures, les ulcères, la fièvre et les troubles du foie et de l'intestin. Dans le but de valoriser la biomasse de la forêt boréale par l'étude de l'activité biologique de composés d'origine naturelle, des extraits de fleurs, de feuilles et de tiges de *Solidago canadensis* ont été étudiés. Les extraits méthanoliques de fleurs, de feuilles et de tiges ont montré des propriétés antioxydantes avec des valeurs ORAC de 2.7 ± 0.9 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour les fleurs, 10.0 ± 0.2 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour les feuilles et 3.6 ± 0.8 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour les tiges. L'extrait méthanolique de fleurs a aussi montré une activité anti-inflammatoire en inhibant la production d'oxyde nitrique de macrophages RAW 264.7 activés avec du LPS (IC_{50} : 8 ± 2 $\mu\text{g/mL}$). Cependant, les extraits de feuilles et de tiges sont inactifs. Le fractionnement de l'extrait de fleurs a mené à l'isolation de cinq dérivés de l'acide caffeoylquinique connus. L'acide 3,4-di-*O*-caffeoylquinique est rapporté pour la première fois dans le *Solidago canadensis*. L'activité anti-inflammatoire des composés isolés a été évaluée, mais ces composés sont inactifs.

**Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts from
*Solidago canadensis***

Marie-Eve Bradette-Hébert, André Pichette, Vakhtang Mshvildadze, Jean Legault*

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555, boulevard de l'Université,
Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1.

Keywords: *Solidago canadensis* L., Asteraceae, anti-inflammatory, antioxidant, isolation,
caffeoylquinic acids

*Address reprint requests to Dr J. Legault

Tel. 00 1 (418) 545-5011. Fax: 00 1 (418) 545-5012.

E-mail : Jean_Legault@uqac.ca

Abstract

Solidago canadensis L. is an herbaceous plant of the family of Asteraceae. In North America, this plant has been used in native medicine for the treatment of pain, burns, ulcers, fever, gastrointestinal and liver diseases. Flowers, leaves and stems methanol extracts have shown antioxidant activities with ORAC values of 2.7 ± 0.9 $\mu\text{mol TE/mg}$ for flowers, 10.0 ± 0.2 $\mu\text{mol TE/mg}$ for leaves and 3.6 ± 0.8 $\mu\text{mol TE/mg}$ for stems. The flowers extract have also shown an anti-inflammatory activity (IC_{50} : 8 ± 2 $\mu\text{g/mL}$) on LPS-activated RAW 264.7 macrophages nitric oxide inhibition. However, leaves and stems methanol extracts were found to be inactive. Through fractionation of the flowers extract, 5 known caffeoylquinic acid derivatives were isolated. To our knowledge, compound **5** (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid) is reported for the first time in *Solidago canadensis*. All isolated compounds were found to be inactive on LPS-activated RAW 264.7 macrophages nitric oxide inhibition.

1. Introduction

Solidago canadensis L. is an Asteraceae widely distributed across North America, occurring in almost every state in United States and throughout Canada. *Solidago canadensis* was used in American native medicine to treat pain (Rousseau, 1945), burns, ulcers (Arnason et al., 1981), fever (Moerman, 2000), gastrointestinal (Turner et al., 1980; Moerman, 2000) and liver (Moerman, 2000) diseases. Anti-inflammatory and antioxidant actions have been reported for extracts of the genus *Solidago* (Arens-Corell and Okpanyi, 1990; Leuschner, 1995). Previous studies on *Solidago canadensis* herbs extracts reported DPPH and luminol free radical scavenging antioxidant activities (Apáti et al., 2003; Papp et al., 2004). Furthermore, roots were demonstrated active when tested for DPPH free radical scavenging, NBT/XO superoxide scavenging and DCF/AAPH peroxy radical scavenging (McCune and Johns, 2002). However, to our knowledge, no antioxidant activity has been reported for *Solidago canadensis* flowers, leaves and stems. The genus *Solidago* contain numerous interesting secondary metabolites such as: flavonoids, phenolic acids and glucosides, polysaccharides, diterpenes, triterpenoid saponosides, tannins, essential oils and others (Thiem et al., 2001). Previous phytochemical studies of *Solidago canadensis* reported the presence of flavonoids (Krepinsky and Herout, 1962; Apáti et al., 2003), phenolic acids (Kalemba, 1992), sesquiterpenes (Bohlmann et al., 1979), diterpenes (Anthonsen et al., 1969; Bohlmann et al., 1979) and saponins (Reznicek et al., 1990).

In this study, we evaluate antioxidant and anti-inflammatory activities of flowers, leaves and stems methanol extracts of *Solidago canadensis*.

2. Materials and methods

2.1 General experimental procedures

NMR spectra were recorded in methanol- d_4 on a Bruker Avance 400 spectrometer (5 mm QNP with Z-gradient probe) operating at 400.13 MHz (^1H) or 100.61 MHz (^{13}C). Chemical shifts were referenced relative to the corresponding residual solvent signals (δ 3.31/49.0 ppm, respectively). The accurate mass determination was carried out with an Applied Biosystems QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS system. All HPLC separations were performed on a preparative Agilent 1100 series with a ZORBAX ODS column C18 (2.1 x 25 cm; 7 μm) at a flow rate of 16 mL/min. Compounds were detected by UV absorption at 254 nm. For all HPLC procedures, solvent A was H_2O + 0.1% HCOOH and solvent B was ACN + 0.1% HCOOH . Silica gel 60 (230-400 Mesh, Silicycle), Diaion HP-20 (Supelco) and silica gel 60 C18 (230-400 Mesh, EMD) were used for column chromatography. The solvents were purchased from EMD. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F_{254} aluminium sheets (Silicycle) using $\text{EtOAc-MeOH-H}_2\text{O}$ (100:16.5:13.5) as solvent system. Detection of the phenolic compounds was carried out by spraying TLC plates with NP/PEG reagent (1% diphenylboric acid 2-aminoethylester in methanol and 5% polyethylene glycol in ethanol) and observing under UV light before and after revelation (254 and 365 nm).

2.2 Plant material

The flowers, leaves and stems of *Solidago canadensis* L. were collected in september 2004 at St-Félicien (48°40'N, 72°27'W), Québec, Canada. The specimens were identified by Mr. Patrick Nadeau (Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Québec, Canada). A voucher specimen was deposited in the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec, Canada (QFA-492115).

2.3 Extraction and isolation

The air-dried flowers, leaves and stems of *Solidago canadensis* (25 g) were extracted with methanol (300 mL) in hot condition under reflux during 2 hours. The methanol extracts were evaporated on a rotary evaporator, under reduced pressure.

For the isolation steps, the air-dried flowers of *Solidago canadensis* (285 g) were extracted with methanol in hot condition (3 x 2.5 L) and then, followed with methanol 80% (3 x 2.5 L) during 2 hours. The combined extracts were evaporated under reduced pressure, yielding a residue (103.81 g), which was suspended in water (400 mL) and successively extracted with dichloromethane (3 x 200 mL) and ethyl acetate (6 x 400 mL), yielding dichloromethane, ethyl acetate and aqueous fractions. The aqueous fraction (66.13 g) of *Solidago canadensis* flowers was fractionated into three fractions (I-III) by chromatography over a silica gel column (7 x 60 cm) using an isocratic solvent system of EtOAc-MeOH-

H₂O (100:16.5:13.5). The fraction II (6.70 g) containing the major constituents was divided into six fractions (A - F) using Diaion (3.2 x 40.5 cm) by elution with MeOH-H₂O (20-80). Fraction B (1.03 g) was separated into nine fractions (B1 – B9) by passage over C18 silica gel column (1.6 x 46 cm), eluting with MeOH 10%. From B1 (214.2 mg), compounds **1** (3.8 mg) and **2** (9.3 mg) were isolated by preparative HPLC (6% solvent B). Fractions B5 (135.1 mg) and B6 (64.9 mg) were combined and then, separated by preparative HPLC (16% solvent B) to afford compounds **3** (9.1 mg), **4** (7.0 mg) and **5** (11.4 mg). Identification of these compounds was performed through NMR (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC and HMBC) and HR-ESI-MS analyses. The data obtained were compared with those reported in the literature (Tatefuji et al., 1996; Tolonen et al., 2002).

2.4 Cell culture

The murine macrophages RAW 264.7 (#TIB-71) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The RAW 264.7 cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Mediatech Cellgro®). Medium was supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), 1 X solution of vitamins (Mediatech Cellgro®), 1 X sodium pyruvate (Mediatech Cellgro®), 1 X non-essential amino acids (Mediatech Cellgro®), 100 IU of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.5 Cytotoxic assay

Exponentially growing cells were plated at a density of 5×10^3 cells per well in 96-well microplates (BD Falcon) in 100 μ L of culture medium and were allowed to adhere for 16 hours before treatment. Then, the cells were incubated for 48 hours in the presence or absence of 100 μ L of increasing concentrations of extracts dissolved in culture medium and an appropriate solvent. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.25% (v/v) to avoid toxicity. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test (O'Brien et al., 2000). Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Extracts are considered cytotoxic when inhibition of cell growth is observed.

2.6 Measurement of the antioxidant activity by ORAC_{FL} assay

The oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) assay was carried out on a Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems). Quercetin was used as a positive control. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 30 seconds after addition of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. Trolox was used as a control standard. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram (μ mol TE/mg).

2.7. Measurement of anti-inflammatory activity by nitric oxide (NO) inhibition on LPS-activated RAW 264.7 macrophages

Exponentially growing cells were plated in 24-well microplates (BD Falcon) at a density of 2×10^5 cells per well in 400 μ L of culture medium and were allowed to adhere overnight. Cells were then treated or not with positive control N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (250 μ mol/L and 1 mmol/L), or increasing concentrations of fractions or pure compounds dissolved in the appropriate solvents, and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24h. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cells were then stimulated with 10 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS). After 24h, cell-free supernatants were collected and stored at -80°C until NO determination using the Greiss reaction (Green et al., 1990) with minor sulphanilamide and 50 μ L of 0.1% N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄ at room temperature for 20 min. Absorbance at 540 nm was then measured using an automated 96-well Varioskan Ascent plate reader (Thermo Electron) and the presence of nitrite was quantified by comparison with an NaNO₂ standard curve. All the samples were tested at the highest concentration without macrophages cytotoxicity. Anti-inflammatory activity was expressed as the concentration of drug inhibiting nitric oxide overproduction by 50% (IC₅₀).

3. Results and Discussion

3.1 Extraction yields

The air-dried flowers, leaves and stems of *Solidago canadensis* were extracted with methanol in hot condition under reflux. As shown in Table 1, the extraction yields are 0.14 g/g for flowers, 0.18 g/g for leaves and 0.09 g/g for stems.

3.2 Antioxidant activity of methanol extracts

The antioxidant activity of flowers leaves and stems methanol extracts was assessed using the ORAC assay (Ou et al., 2001). As shown in Table 1, in comparison to quercetin, all extracts exhibited moderate antioxidant activities with ORAC values of 2.7 ± 0.9 $\mu\text{mol TE/mg}$ for flowers, 10.0 ± 0.2 $\mu\text{mol TE/mg}$ for leaves and 3.6 ± 0.8 $\mu\text{mol TE/mg}$ for stems. Hence, leaves methanol extract was found to possess the best antioxidant activity. Previous phytochemical studies of *Solidago canadensis* have shown antioxidant activity for herbs extracts (Apáti et al., 2003; Papp et al., 2004). These results support the ethnopharmacological use of *Solidago canadensis* in pathologies implying reactive oxygen species.

3.3. Macrophages cytotoxicity and anti-inflammatory activity of extracts

The claimed effect of *Solidago canadensis* on inflammatory diseases and related disorders by the American native medicine was challenged by testing flowers, leaves and stems methanol extracts of *Solidago canadensis* for anti-inflammatory activity using LPS-activated RAW 264.7 macrophages nitric oxide (NO) inhibition. Stimulation of RAW 264.7 macrophages by LPS induces iNOS and overproduction of NO which can be detected and quantified photometrically by a simple colorimetric reaction (Green et al., 1990) as described in materials and methods. L-NAME, a NO synthase inhibitor, prevents the formation of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (Paul et al., 1997) and thus was used as positive control. First, the macrophages cytotoxicity of extracts was investigated. As shown in Table 2, the highest concentration without macrophages cytotoxicity is 10.8 µg/mL for flowers, 13.0 µg/mL for leaves and 111.0 µg/mL for stems methanol extracts. Flowers methanol extract of *Solidago canadensis* inhibited overproduction of NO with an IC₅₀ of 8 ± 2 µg/mL. However, leaves and stems methanol extracts were found to be inactive. Thus, the flowers are the most interesting part of *Solidago canadensis* for anti-inflammatory activity. These results support the ethnopharmacological use of *Solidago canadensis* flowers in the treatment of inflammation diseases implying NO and peroxinitrite.

3.4 Isolation of compounds from the flowers extract and evaluation of anti-inflammatory activity

Fractionation was carried out to characterize the active principles responsible of the anti-inflammatory activity of the flowers extract of *Solidago canadensis*. The extract was thus suspended into H₂O and then partitioned successively with DCM and EtOAc. Because of his wealth and his simplicity, as shown by TLC, the aqueous fraction has been chose. Further fractionations have led to the isolation of five known caffeoylquinic acid derivatives (**1-5**) which are the major constituents of the aqueous fraction: neochlorogenic acid (**1**, 3-*O*-caffeoylquinic acid), chlorogenic acid (**2**, 5-*O*-caffeoylquinic acid), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**3**), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**4**) and 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (**5**). To our knowledge, compound **5** is reported for the first time in *Solidago canadensis*. Caffeoylquinic acid derivatives have been previously reported to have several interesting therapeutic properties, which include reducing inflammation (Facino et al., 1993; Rastrelli et al., 1998); activities on some human leukocyte functions related to inflammatory mechanism such as monocyte migration and reducing of superoxide anion production (Peluso et al., 1995); antioxidative activities (Kwon et al., 2000; Kweon et al., 2001; Stewart et al., 2005); inhibitory activities on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of the liver (Kimura et al., 1984); and finally, anti-viral activity (Zhu et al., 1999). The anti-inflammatory activity of isolated compound was evaluated using LPS-activated RAW 264.7 macrophages nitric oxide (NO) inhibition. All isolated compounds were found to be inactive (data not presented).

In summary, this study show that flowers, leaves and stems methanol extracts of *Solidago canadensis* posses antioxidant activities and flowers methanol extract posses anti-inflammatory activity, which support ethnopharmacological use of *Solidago canadensis* in American native medicine. Isolation procedures of the aqueous fraction of flowers extract have led to the isolation of five known caffeoylquinic acid derivatives (**1-5**) which are the major constituents of the aqueous fraction. To our knowledge, compound **5** (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid) is reported for the first time in *Solidago canadensis*. However, these isolated compounds are not responsible of the anti-inflammatory activity. Further isolation procedures should be done to find the active principle of flowers extract.

4. Acknowledgments

The authors would like to thanks Serge Lavoie for his help and suggestions, Carole Grenon for technical assistance, Angelique Longtin for cytotoxic and anti-inflammatory assays and Karl Girard Lalancette for antioxidant assays. This work was supported by Action Concertée FQRNT – Fonds de la recherche forestière du Saguenay - Lac-Saint-Jean.

5. References

- Apáti, P., Szentmihályi, K., Kristo, Sz.T., Papp, I., Vinkler, P., Szoke, É., Kéry, Á., 2003. Herbal remedies of *Solidago* – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32, 1045-1053.
- Arens-Corell, M., Okpanyi, S.N., 1990. anti-inflammatory and analgesic actions of a model anit-rheumatic phytotherapeutic fixed combination drug: Phytodolor N. *Planta Medica* 56, 656-657.
- Arnason, T., Hebda, R.J., Johns, T., 1981. Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany* 59, 2189-2325.
- Anthonsen, T., McCabe, P.H., McCrindle, R., Murray, R.D.H., 1969. Constituents of *Solidago* species. *Tetrahedron* 25, 2233-2239.
- Bohlmann, F., Fritz, U., King, R.M., Robinson, H., 1980. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. *Phytochemistry* 19, 2655-2661.
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S., 2002. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* 23, 719-735.
- Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Marinello, C., Arlandini, E., Franzoi, L., Colombo, M., Pietta, P., Mauri, P., 1993. Direct characterization of caffeoyl esters with antihyaluronidase activity in crude extracts from *Echinacea angustifolia* roots by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Il Farmaco* 48, 1447-1461.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Frère Marie-Victorin, "Flore Laurentienne" Troisième édition, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, 1995, p.601.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs Jr, J.B., Nacy, C.A., 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependant killing mechanism. *The Journal of Immunology* 144, 278-283.
- Kalembe, D., 1992. Phenolic acids in four *Solidago* species. *Pharmazie* 47, 471-472.

Kim, Y., Han, M.S., Lee, J.S., Kim, J., Kim, Y.C., 2003. Inhibitory phenolic amides on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells from *Beta vulgaris* var. *cicla* seeds. *Phytotherapy Research* 17, 983-985.

Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I., Arichi, S., 1984. Studies on the activities of tannins and related compounds; V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Medica* 50, 473-477.

Krepinsky, J., Herout, V., 1962. Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis* L. *Chemical Communications* 27, 2459-2462.

Kweon, M.-H., Hwang, H.-J., Sung, H.-C., 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 4646-4655.

Kwon, H.J., Kang, M.J., Kim, H.J., Choi, J.S., Paik, K.J., Chung, H.Y., 2000. Inhibition of NF κ B by methyl chlorogenate from *Eriobotrya japonica*. *Molecules and Cells* 10, 241-246.

Leuschner, J., 1995. Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* herb. extract. *Arzneimittel-Forschung Drug Research* 45, 165-168.

Liang, Y.-C., Huang, Y.-T., Tsai, S.-H., Lin-Shiau, S.-Y., Chen, C.-F., Lin, J.-K., 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945-1952.

McCune, L.M., Johns, T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology* 82, 197-205.

Moerman, D.E., 2000. Native American ethnobotany. Third edition, Ed. Timber Press Inc., Portland, USA, p. 536.

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

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4619-4626.

Papp, I., Apáti, P., Andrasek, V., Blázovics, A., Balázs, A., Kursinszki, L., Kite, G.C., Houghton, P.J., Kéry, Á., 2004. *Chromatographia* 60, S93-S100.

Paul, A., Bryant, C., Lawson, M.F., Chilvers, E.R., Plevin, R., 1997. Dissociation of lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide synthase and inhibition of DNA synthesis in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 120, 1439-1444.

Peluso, G., De Feo, V., De Simone, F., Bresciano, E., Vuotto, M.L., 1995. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *Journal of Natural Products* 58, 639-646.

Rastrelli, L., Saravia, A., Hernandez, M., De Simone, F., 1998. Antiinflammatory activity-guided fractionation of *Gnaphalium stramineum*. *Pharmaceutical Biology* 36, 315-319.

Reznicek, G., Jurenitsch, J., Kubelka, W., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., 1990. The first spectroscopically confirmed saponins from *Solidago canadensis*. *Planta Medica* 56, 554.

Rousseau, J., 1945. Études ethnobotaniques québécoises : Le folklore botanique de Caughnawaga. Contributions de l'Institut botanique de l'Université de Montréal 55, 7-72 (pp.65).

Stewart, A.J., Mullen, W., Crozier, A., 2005. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Molecular Nutrition and Food Research* 49, 52-60.

Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M., 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19, 966-970.

Thiem, B., Wesolowska, M., Skrzypczak, L., Budzianowski, J., 2001. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from *in vitro* culture. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58, 277-281.

Tolonen, A., Joutsamo, T., Mattila, S., Kämäräinen, T., Jalonen, J., 2002. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. *Phytochemical Analysis* 13, 316-328.

Turner, N.J., Bouchard, R., Kennedy, D.I.D., 1980. Ethnobotany of the Okanagan-Colville Indians of British Columbia and Washington, British Columbia Provincial Museum, Occasional Paper Series No.21, p.84.

Vamvakas, S., Schmidt, H.H.H.W., 1997. Just say NO to cancer? *Journal of the National Cancer Institute* 89, 406-407.

Zhu, K., Cordeiro, M.L., Atienza, J., Robinson Jr., W.E., Chow, S.A., 1999. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *Journal of Virology* 73, 3309-3316.

Table 1.Extraction yields and antioxidant activity of methanol extracts of *Solidago canadensis*.

Plant part	Yield (g/g) ^a	ORAC value (μ mol TE/mg) ^b
Flowers	0.14	2.7 \pm 0.9
Leaves	0.18	10.0 \pm 0.2
Stems	0.09	3.6 \pm 0.8
Quercetin		17 \pm 2

^a g solid extract/g dried biomass.^b Data are expressed as means \pm standard deviations of three determinations.

TE: Trolox equivalent.

Table 2.Highest concentration without macrophages cytotoxicity and anti-inflammatory activity of methanol extracts of *Solidago canadensis*.

Plant part	Highest concentration without macrophages cytotoxicity (μ g/mL)	Anti-inflammatory activity IC ₅₀ (μ g/mL) ^a
Flowers	10.8	8 \pm 2
Leaves	13.0	inactive
Stems	111.0	inactive

^a Data are expressed as means \pm standard deviations of three determinations.

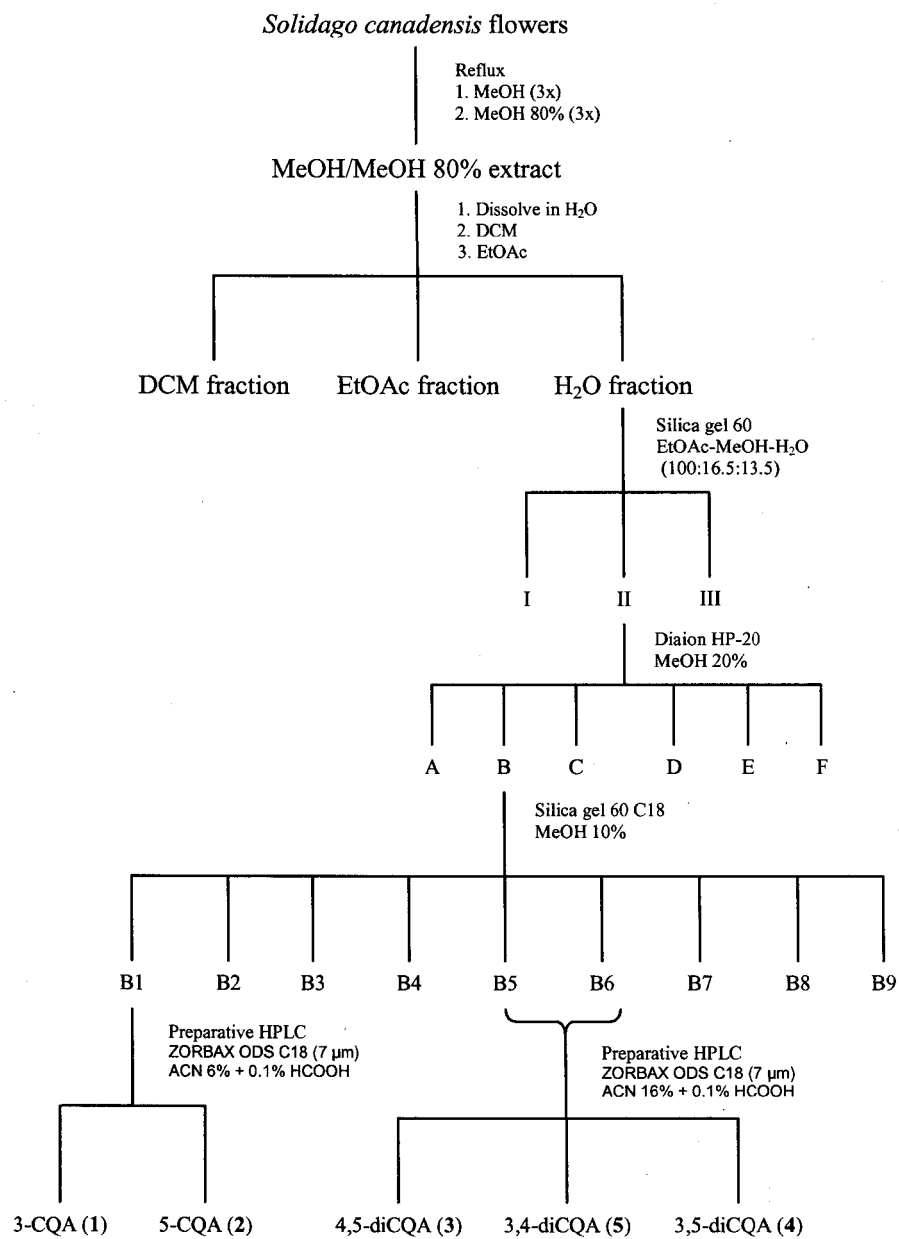


Fig. 1. Fractionation of *Solidago canadensis* flowers.

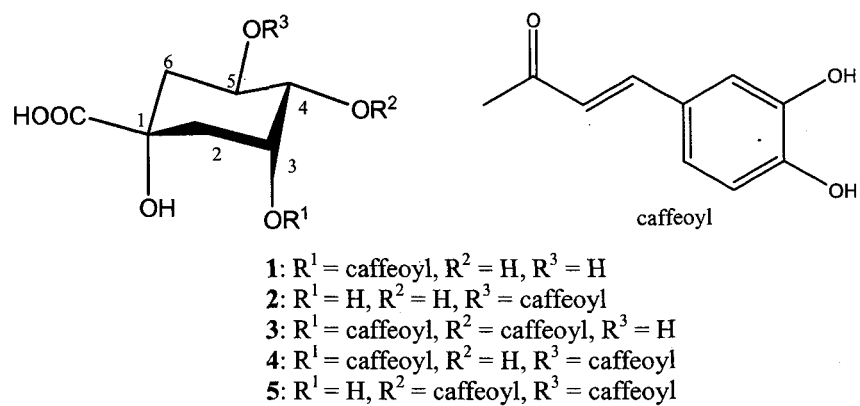


Fig. 2. Molecular structures of isolated compounds from aqueous extract of *Solidago canadensis* flowers.

CHAPITRE V
ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

5. État d'avancement du projet

5.1 Introduction

Plusieurs espèces de la forêt boréale ont été rapportées dans la littérature pour des applications anti-inflammatoires en médecine traditionnelle amérindienne. Les principales espèces utilisées étaient *Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Ledum groenlandicum*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pinus banksiana*, *Populus balsamifera*, *Populus tremuloides*, *Solidago canadensis*, *Vaccinium angustifolium* et *Vaccinium myrtilloides* (Moerman, 2000). Ces espèces ont fait l'objet d'un criblage afin d'évaluer leur activité anti-inflammatoire dans le but de traiter des malaises associés à cette réaction de défense immunitaire. Les activités antioxydante et anti-cancéreuse ont également été évaluées afin de maximiser les retombées de cette étude.

5.2 Préparation des espèces végétales

Les espèces sélectionnées (Moerman, 2000) ont d'abord été récoltées (Tableau 2), triées, séchées à l'air libre et broyées. Chaque matrice végétale a ensuite été extraite par Soxhlet avec du méthanol (350 mL). Chaque extrait a été évaporé sous pression réduite et séché sous vide.

Tableau 2. Données relatives à la récolte des espèces sélectionnées

Espèce	Partie	Endroit	Date
<i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller	aiguilles	Réserve faunique des Laurentides	12 juillet 2003
	branches		
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch.	aiguilles	Réserve faunique des Laurentides	20 septembre 2004
	branches		
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Ledum groenlandicum</i> Oeder	feuilles	St-Félicien	26 septembre 2004
	tiges		
	racines		
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	aiguilles	St-Félicien	26 septembre 2004
	branches		
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg	aiguilles	Réserve faunique des Laurentides	12 juillet 2003
	branches		
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Pinus banksiana</i> Lambert	cônes	Réserve faunique des Laurentides	14 octobre 2004
	aiguilles		
	branches		
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Populus balsamifera</i> Linné	branches	Réserve faunique des Laurentides	20 septembre 2004
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Populus tremuloides</i> Michaux	branches	Réserve faunique des Laurentides	20 septembre 2004
	tronc avec écorces		
	écorces		
	racines		
<i>Solidago canadensis</i> Linné	fleurs	Laterrière	28 août 2003
	feuilles		
	tiges		
<i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton	tiges	St-Félicien	26 septembre 2004
	racines		
<i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux	tiges	St-Félicien	26 septembre 2004
	racines		

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été faite en fonction du pouvoir d'inhibition sur la production d'oxyde nitrique de macrophages activés (Green et al., 1990). La concentration maximale sans cytotoxicité sur les macrophages a d'abord été établie pour chaque extrait afin de pouvoir évaluer la production réelle d'oxyde nitrique des macrophages activés. Cette évaluation a été réalisée selon la méthode de réduction à la résazurine (O'Brien et al., 2000). La procédure expérimentale pour l'évaluation de la cytotoxicité des extraits sur les macrophages et l'activité anti-inflammatoire est présentée au chapitre IV. Plusieurs extraits ont démontré une cytotoxicité élevée. Ainsi, l'activité anti-inflammatoire de plusieurs extraits n'a pu être évaluée à des doses élevées. Les résultats sont présentés au Tableau 3. L'extrait de fleurs de *Solidago canadensis* se démarque en étant le seul à inhiber plus de 50% de la production d'oxyde nitrique et ce, à une concentration relativement faible (65 ± 3 % d'inhibition à $10.8 \mu\text{g/mL}$). L'espèce possédant l'activité anti-inflammatoire la plus intéressante est le *Solidago canadensis* et l'extrait de fleurs est le plus actif.

5.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée avec la méthode ORAC (Ou et al., 2001). La méthodologie pour cette évaluation est présentée au chapitre IV. Tel que présenté au Tableau 4, certaines espèces se démarquent en étant plus actives que la quercétine ($17 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$), un composé reconnu pour son activité antioxydante élevée (Ou et al., 2002). Il est question de *Picea mariana* (aiguilles ($28 \pm 5 \mu\text{mol TE/mg}$), branches ($21 \pm 5 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($34 \pm 8 \mu\text{mol TE/mg}$), écorces ($40 \pm 4 \mu\text{mol TE/mg}$) et racines ($60 \pm 20 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Ledum groenlandicum* (feuilles ($25 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$), tiges ($46 \pm 8 \mu\text{mol TE/mg}$) et racines ($44 \pm 7 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Abies balsamea* (racines ($42 \pm 3 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Picea glauca* (branches ($21 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($27 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$) et écorces ($34 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Larix laricina* (branches ($26 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($19 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$) et écorces ($26 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Vaccinium myrtilloides* (racines ($25.0 \pm 0.5 \mu\text{mol TE/mg}$)) et *Pinus banksiana* (cônes ($22 \pm 4 \mu\text{mol TE/mg}$)). Tous les extraits de *Ledum groenlandicum* et de *Picea mariana* possèdent une activité supérieure à celle observée pour la quercétine, il s'agit donc d'espèces très intéressantes au niveau antioxydant. Les résultats obtenus avec les feuilles et les tiges du *Ledum groenlandicum* sont rapportés dans un article publié dans *Journal of Ethnopharmacology* (Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 22-28).

5.3.3 Évaluation de l'activité anticancéreuse

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits a été évaluée sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, un carcinome du poumon (A-549) et un adénocarcinome du colon (DLD-1). La cytotoxicité des extraits a également été testée sur des fibroblastes humains normaux (WS1) afin d'évaluer les impacts sur des cellules saines (Tableau 5). L'activité anticancéreuse a été évaluée *in vitro* selon le test de réduction à la résazurine (O'brien et al., 2000). La procédure expérimentale pour l'évaluation de l'activité anticancéreuse est présentée au chapitre III. Selon les critères du National Cancer Institute, un extrait est considéré actif lorsque son IC_{50} est inférieure à 100 $\mu\text{g/mL}$ (Boyd, 1997). Parmi tous les extraits testés, les racines de *Pinus banksiana* (A-549: $50 \pm 4 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $42 \pm 3 \mu\text{g/mL}$; WS1: $46 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), les écorces d'*Abies balsamea* (A-549: $88 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $92 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; WS1: $70 \pm 8 \mu\text{g/mL}$) et le tronc avec écorces de *Larix laricina* (A-549: $112 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $96 \pm 13 \mu\text{g/mL}$; WS1: $105 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) sont les extraits qui possèdent les activités les plus intéressantes. Cependant, ces IC_{50} sont élevées par rapport aux résultats obtenus avec l'étoposide (A-549: $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $4.8 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$) et le 5-fluorouracil (A-549: $4.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $11 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), des anticancéreux reconnus.

5.4 Résultats

Tableau 3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'espèces de la forêt boréale.

Espèce	Partie	Concentration maximale sans cytotoxicité sur les macrophages (µg/mL)	Inhibition NO à la concentration maximale (%) ^a
<i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller	aiguilles	1.4	8 ± 2
	branches	2.7	12 ± 1
	tronc avec écorces	4.7	13.7 ± 0.3
	écorces	2.6	8 ± 2
	racines	13.0	2 ± 1
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch.	aiguilles	2.7	inactif
	branches	2.6	18 ± 1
	tronc avec écorces	5.0	26.9 ± 0.5
	écorces	2.5	28 ± 1
	racines	98.5	9 ± 1
<i>Ledum groenlandicum</i> Oeder	feuilles	97.9	13 ± 1
	tiges	98.6	8 ± 1
	racines	195.6	inactif
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	aiguilles	1.4	inactif
	branches	4.8	35 ± 1
	tronc avec écorces	4.7	39 ± 1
	écorces	5.0	18 ± 1
<i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg	racines	102.9	22 ± 1
	aiguilles	2.2	6 ± 2
	branches	2.3	inactif
	tronc avec écorces	2.7	10.5 ± 0.5
	écorces	5.4	11 ± 3
<i>Pinus banksiana</i> Lambert	racines	50.0	18 ± 1
	cônes	2.5	29 ± 1
	aiguilles	4.7	37.5 ± 0.5
	branches	1.3	10.6 ± 0.5
	tronc avec écorces	1.3	8 ± 1
	écorces	2.5	20 ± 1
<i>Populus balsamifera</i> Linné	racines	13.0	inactif
	branches	13.0	3 ± 1
	tronc avec écorces	13.0	inactif
	écorces	6.0	10 ± 2
<i>Populus tremuloides</i> Michaux	racines	12.0	6 ± 3
	branches	13.0	4 ± 1
	tronc avec écorces	13.0	inactif
	écorces	6.0	6 ± 2
<i>Solidago canadensis</i> Linné	racines	12.0	inactif
	fleurs	10.8	65 ± 3
	feuilles	13.0	4 ± 2
<i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton	tiges	111.0	21 ± 1
	tiges	195.2	inactif
	racines	51.0	13 ± 1
<i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux	tiges	25.0	8 ± 3
	racines	199.5	inactif

NO : Nitric oxide

^a Moyenne de trois déterminations ± déviation standard.

Tableau 4. Évaluation de l'activité antioxydante d'espèces de la forêt boréale.

Espèce	Partie	ORAC _{FL} ($\mu\text{mol TE/mg}$) ^a
<i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller	aiguilles	9 \pm 3
	branches	7 \pm 1
	tronc avec écorces	9.6 \pm 0.5
	écorces	3.4 \pm 0.5
	racines	42 \pm 3
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch.	aiguilles	8.4 \pm 0.9
	branches	26 \pm 2
	tronc avec écorces	19 \pm 2
	écorces	26 \pm 2
	racines	10 \pm 2
<i>Ledum groenlandicum</i> Oeder	feuilles	25 \pm 1
	tiges	46 \pm 8
	racines	44 \pm 7
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	aiguilles	13.9 \pm 0.3
	branches	21 \pm 1
	tronc avec écorces	27 \pm 1
	écorces	34 \pm 2
	racines	11 \pm 1
<i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg	aiguilles	28 \pm 5
	branches	21 \pm 5
	tronc avec écorces	34 \pm 8
	écorces	40 \pm 4
	racines	60 \pm 20
<i>Pinus banksiana</i> Lambert	cônes	22 \pm 4
	aiguilles	9.1 \pm 0.9
	branches	6.7 \pm 0.8
	tronc avec écorces	9.7 \pm 0.8
	écorces	n.d.
	racines	11 \pm 1
<i>Populus balsamifera</i> Linné	branches	6.9 \pm 0.8
	tronc avec écorces	5.4 \pm 0.4
	écorces	10 \pm 1
	racines	4.3 \pm 0.6
<i>Populus tremuloides</i> Michaux	branches	9.8 \pm 0.8
	tronc avec écorces	5.1 \pm 0.3
	écorces	6.0 \pm 0.5
	racines	7.8 \pm 0.8
<i>Solidago canadensis</i> Linné	fleurs	2.7 \pm 0.9
	feuilles	10.0 \pm 0.2
	tiges	3.6 \pm 0.8
<i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton	tiges	8 \pm 1
	racines	5 \pm 1
<i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux	tiges	6.3 \pm 0.8
	racines	25.0 \pm 0.5
Quercétine		17 \pm 2

ORAC : Oxygen radical antioxidant activity; TE : Trolox equivalents; n.d.: non déterminé.

^a Moyenne de trois déterminations \pm déviation standard.

Tableau 5. Évaluation de l'activité anticancéreuse d'espèces de la forêt boréale.

Espèce	Partie	IC ₅₀ (µg/mL) ^a		
		A-549	DLD-1	WS1
<i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller	aiguilles	inactif	inactif	inactif
	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	88 ± 9	92 ± 9	70 ± 8
	racines	inactif	inactif	55 ± 3
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch.	aiguilles	inactif	inactif	inactif
	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	112 ± 9	96 ± 13	105 ± 4
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Ledum groenlandicum</i> Oeder	feuilles	inactif	inactif	inactif
	tiges	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	aiguilles	inactif	inactif	inactif
	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg	aiguilles	inactif	inactif	inactif
	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Pinus banksiana</i> Lambert	cônes	inactif	inactif	inactif
	aiguilles	inactif	inactif	inactif
	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	50 ± 4	42 ± 3	46 ± 3
<i>Populus balsamifera</i> Linné	branches	inactif	inactif	inactif
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Populus tremuloides</i> Michaux	branches	inactif	inactif	91 ± 7
	tronc avec écorces	inactif	inactif	inactif
	écorces	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Solidago canadensis</i> Linné	fleurs	inactif	inactif	inactif
	feuilles	inactif	inactif	inactif
	tiges	inactif	inactif	inactif
<i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton	tiges	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
<i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux	tiges	inactif	inactif	inactif
	racines	inactif	inactif	inactif
Étoposide		1.1 ± 0.1	4.8 ± 0.8	-
5-fluorouracil		4.8 ± 0.6	11 ± 2	-

^a Moyenne de trois déterminations ± déviation standard.

5.5 Conclusion

Le criblage effectué au début du projet a permis de cibler des espèces démontrant certains potentiels bioactifs. Le *Solidago canadensis* est la seule espèce possédant une activité anti-inflammatoire intéressante. Toutes les espèces étudiées ont démontré une activité antioxydante. Cependant, le *Ledum groenlandicum* et le *Picea mariana* sont les espèces les plus intéressantes. En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, les extraits d'*Abies balsamea*, de *Larix laricina* et de *Pinus banksiana* possèdent le plus de potentiel. L'ensemble des résultats démontre l'intérêt de poursuivre des recherches visant à approfondir les composés responsables de ces activités.

CHAPITRE VI**CONCLUSION**

6. Conclusion

L'objectif principal de ce projet de recherche visait à valoriser la biomasse de la forêt boréale notamment par l'étude du potentiel anti-inflammatoire d'extraits et de composés issus de la forêt boréale. Ainsi, des plantes potentiellement anti-inflammatoires de la forêt boréale ont été sélectionnées en se basant sur la médecine traditionnelle amérindienne. Les différentes parties (fleurs, feuilles, tiges et racines) des plantes sélectionnées ont été extraites. Les activités anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse des différents extraits ont été évaluées. Au cours de ce projet de maîtrise, il a été démontré que les fleurs de *Solidago canadensis* possèdent une activité anti-inflammatoire. De plus, les fleurs, les feuilles et les tiges de *Solidago canadensis* ont montré une activité antioxydante. Par conséquent, ces résultats supportent l'utilisation ethnopharmacologique de cette plante par les peuples ancestraux de l'Amérique du Nord. L'extrait de fleurs de *Solidago canadensis* a été sélectionné et les composés majoritaires de la fraction aqueuse ont été isolés par chromatographie et HPLC préparatif. La caractérisation par résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse a mené à l'identification de ces composés. De la sorte, cinq dérivés connus d'acide caffeoylequinique ont été isolés. Toutefois, il s'avère que ces composés ne sont pas responsables de l'activité anti-inflammatoire observée pour l'extrait. Au cours de ce projet, l'acide 3,4-di-*O*-caffeoylequinique a été rapporté pour la première fois à partir du *Solidago canadensis*. Également, les travaux de séparation ont mené à l'isolation de la quercétine et du 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadièn-15,16-

olide (solicanolide), un nouveau diterpène de la famille des labdanes. Ce nouveau composé a démontré une activité anticancéreuse intéressante sur les lignées cellulaires A-549, DLD-1 et WS1. Cependant, les autres composés isolés se sont révélés inactifs.

Étant donné que les composés isolés dans l'extrait de fleurs du *Solidago canadensis* ne sont pas responsables de l'activité anti-inflammatoire observée pour l'extrait, il serait pertinent d'effectuer des travaux d'isolation supplémentaires. En ce qui concerne le solicanolide, le nouveau diterpène de type labdane isolé à partir du *Solidago canadensis* au cours de ce projet de maîtrise, il serait intéressant d'en isoler à nouveau afin de compléter sa caractérisation. Grâce à la méthode des esters de Mosher et la diffraction des rayons X, la stéréochimie de la fonction hydroxyle en C-16 du solicanolide pourrait être élucidée. Par ailleurs, comme une activité anticancéreuse intéressante a été observée, la cytotoxicité de ce composé pourrait être évaluée sur davantage de lignées cellulaires. Également, il serait pertinent de faire une étude plus approfondie au niveau de l'activité biologique puisqu'il s'agit d'un nouveau composé et que par conséquent, son potentiel n'a pas été évalué de manière approfondie.

CHAPITRE VII
BIBLIOGRAPHIE

Publications et livres

Anthonsen, T., McCabe, P.H., McCrindle, R., Murray, R.D.H., 1969. Constituents of *Solidago* species I – The constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. Tetrahedron 25, 2233-2239.

Anthonsen, T., McCabe, P.H., McCrindle, R., Murray, R.D.H., Young, G.A.R., 1970. Constituents of *Solidago* species II – Reactions of solidagenone, the major diterpenoid from *Solidago canadensis* L. Tetrahedron 26, 3091-3097.

Apáti, P., Szentmihályi, K., Balázs A., Baumann, D., Hamburger, M., Kristó, T.Sz., Szöke, É., Kéry, Á., 2002. HPLC analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from canadian goldenrod (*Solidago canadensis*). Chromatographia 56, S-65-S-68.

Apáti, P., Szentmihályi, K., Kristó, Sz.T., Papp, I., Vinkler, P., Szöke, É., Kéry, Á.J., 2003. Herbal remedies of *Solidago* – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 32, 1045-1053.

Apáti, P., Szentmihályi, K., Vinkler, P., Szöke, É., Kéry, Á., 2003. Nutritional value and phytotherapeutic relevance of solidaginis herba extracts obtained by different technologies. Acta Alimentaria 32, 41-51.

Arens-Corell, M., Okpanyi, S.N., 1990. Anti-inflammatory and analgesic actions of a model anti-rheumatic phytotherapeutic fixed combination drug: Phytodolor N. Planta Medica 56, 656-657.

Bohlmann, F., Fritz, U., King, R.M., Robinson, H., 1980. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. Phytochemistry 19, 2655-2661.

Boufford, D.E., "Flora of North America", Oxford University Press, New York, USA, 1993, vol. 20, p. 146-157.

Boulet, L.P., Becker, A., Bérubé, D., Beveridge, R., Ernst, P., 1999. Canadian asthma consensus report. Canadian Medicinal Association Journal 161, 1-5.

Boyd, M.R., "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval", Teicher, B. A., Ed., Humana Press: Totowa, NJ, 1997, pp. 23.

Bradette-Hébert, M.E., Legault, J., Lavoie, S., Pichette, A., 2008. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 56, 82-84.

Bryant, D., Nielsen, D., Tangley, L., "Les dernières forêts-frontière: écosystèmes et économies à la limite", Institut des ressources mondiales, Washington DC., United States, 1997, pp.42.

Chaturvedula, V.S.P., Zhou, B.-N., Gao, Z., Thomas, S.J., Hecht, S.M., Kingston, D.G.I., 2004. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β . *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 6271-6275.

Choi, S.Z., Sang, U., Bae, S.Y., Pyo, S.N., Lee, K.R., 2005. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virgaurea* var. *gigantea*. *Archives of Pharmacal Research* 28, 49-54.

Connolly, J.D., Hill, R.A., "Dictionary of terpenoids, Volume 1: Mono- and sesquiterpenoids", Chapman & Hall, London, UK, 1991, pp. 653.

Connolly, J.D., Hill, R.A., "Dictionary of terpenoids, Volume 2: Di- and higher terpenoids", Chapman & Hall, London, UK, 1991, pp. 1459.

Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 22-28.

Frère Marie-Victorin, "Flore Laurentienne", Troisième édition, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, 1995, pp.1093.

Gosset, P., Lassalle, P., Molet, S., Tonnel, A.B., 1998. Interactions cellules inflammatoires-endothélium dans la réaction inflammatoire allergique, *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 38, 175-181.

Gross, S.C., Goodarzi, G., Watabe, M., 2002. Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in a SCID mouse model, *Nutrition and Cancer - An International Journal* 43, 76-81.

Harvey, A., 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* 5, 294-300.

Kalembe, D., 1992. Phelolic acids in four *Solidago* species. *Pharmazie* 47, 471-472.

Kalembe, D., Thiem, B., 2004. Constituents of the essential oils of four micropropagated *Solidago* species. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 40-43.

Krepinsky, J., Herout, V., 1962. Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis* L., Chemical Communications 27, 2459-2462.

Laberge et al., "Études des variations géographiques et annuelles de la fréquence de décès, d'hospitalisations et de visites à l'urgence pour cause d'asthme au Québec", Direction de la santé publique, RRSSS de Québec, Québec, Canada, 2000, pp.79.

Lemanske, R.F Jr., Busse, W.W., 2003. Asthma, The Journal of Allergy and Clinical Immunobiology 111, 502-519.

Leuschner, J., 1995. Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* herb. extract. Arzneimittel-Forschung Drug Research 45, 165-168.

Lu, T., Cantrell, C.L., Robbs, S.L., Franzblau, S.G., Fischer, N.H., 1998. Antimycobacterial matricaria esters and lactones from Asteraceae species. Planta medica 64, 665-667.

Lu, T., Menelaou, M.A., Vargas, D., Fronczek, F.R., Fischer, N.H., 1993. Polyacetylenes and diterpenes from *Solidago canadensis*. Phytochemistry 32, 1483-1488.

McCune, L.M., Johns T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. Journal of Ethnopharmacology 82, 197-205.

Melzig, M.F., 2004. Goldenrod - A classical exponent in the urological phytotherapy. Wiener Medizinische Wochenschrift 154, 523-527.

Metzner, J., Hirschelmann, R., Hiller, K., 1984. Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide, a phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L. Pharmazie 39, 869-670.

Moerman, D.E., "Native American ethnobotany", Third edition, Ed. Timber Press Inc., Portland, United States, 2000, pp. 536.

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

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4619-4626.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2772-2777.
- Papp, I., Apáti, P., Andrasek, V., Blázovics, A., Balázs, A., Kursinszki, L., Kite, G.C., Houghton, P.J., Kéry, Á., 2004. LC-MS analysis of antioxidant plant phenoloids. *Chromatographia* 60, S93-S100.
- Pauli, G.F., Poetsch, F., Nahrstedt, A., 1998. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical analysis* 9, 177-185.
- Pfaller, M.A., Burmeister, L., Bartlett, M.S., Rinaldi, M.G., 1988. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 1437-1441.
- Reznicek, G., Jurenitsch, J., Kubelka, W., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., 1990. The first spectroscopically confirmed saponins from *Solidago canadensis*. *Planta Medica* 56, 554.
- Reznicek, G., Jurenitsch, J., Plasun, M., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., Kubelka, W., 1991. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* 30, 1629-1633.
- Reznicek, G., Jurenitsch, J., Freiler, M., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., Kubelka, W., 1992. Isolation and structure elucidation of further new saponins from *Solidago canadensis*. *Planta Medica* 58, 94-98.
- Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J., Astudillo, L., 2002. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of ethnopharmacology* 81, 111-115.
- Thiem, B., Wesolowska, M., Skrzypczak, L., Budzianowski, J., 2001. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from *in vitro* culture. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58, 277-281.
- To, W.K., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., 1995. Comparative evaluation of macrodilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2660-2664.
- Weber, E., 1998. The dynamics of plant invasions: a case study of three exotic goldenrod species (*Solidago* L.) in Europe. *Journal of Biogeography* 25, 147-154.

Sites internet

http://www.mamr.gouv.qc.ca/regions/regi_rura_reus_prod.asp:

Produits forestiers non ligneux: nouvelle économie forestière. Ministère des affaires municipales et des régions, Gouvernement du Québec.

Dernière mise à jour : 24-05-2007

<http://www.mrnfp.gouv.qc.ca/forets/modernisation/modernisation-PGAF.jsp>:

Report des plans généraux d'aménagement forestier et baisse de l'attribution de la matière ligneuse. Ministère des ressources naturelles et de la faune, Gouvernement du Québec.

Dernière mise à jour : 15-04-2008

<http://www.pq.poumon.ca/diseases-maladies/asthma-asthme/asthma-asthme.php>:

Asthme. Association pulmonaire du Québec.

Dernière mise à jour : 26-03-2008

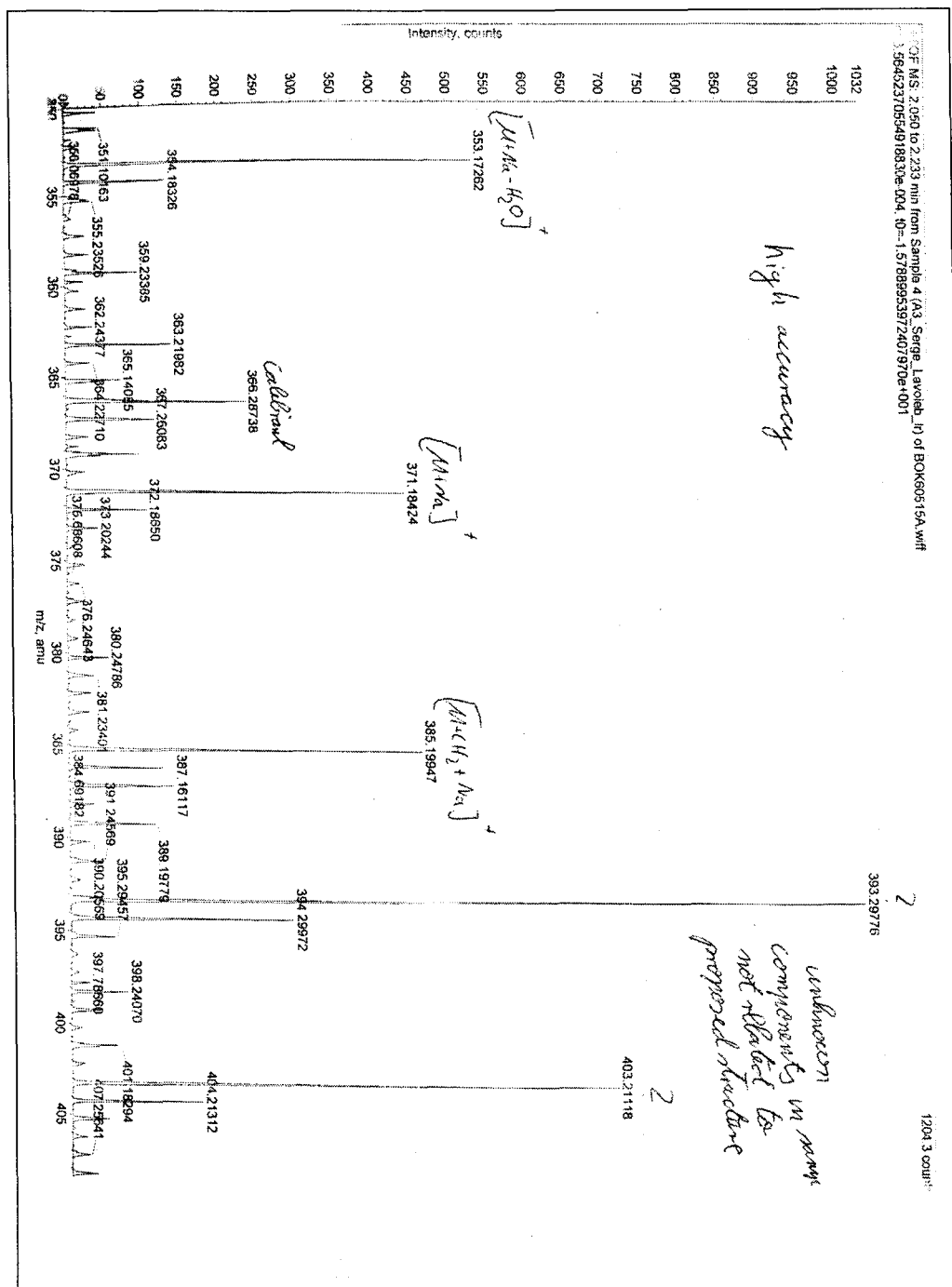
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SOCA6>:

Natural resources conservation service, United States department of agriculture.

Dernière mise à jour : 27-03-2007

CHAPITRE VIII**ANNEXES**

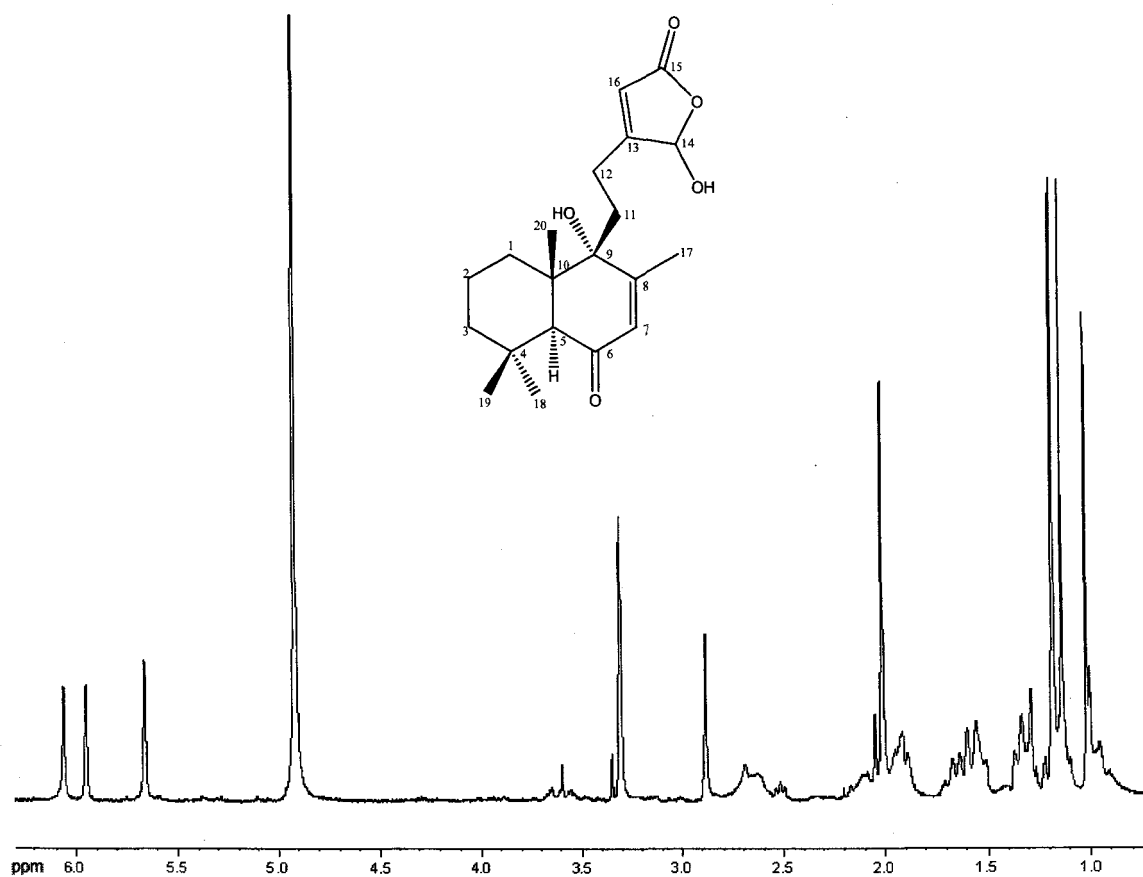
ANNEXE 1.**SPECTRE DE MASSE DU SOLICANOLIDE**



HR-ESI-MS m/z 371.1834 $[M + Na]^+$
Calculé pour $C_{20}H_{28}O_5Na$, 371.1842

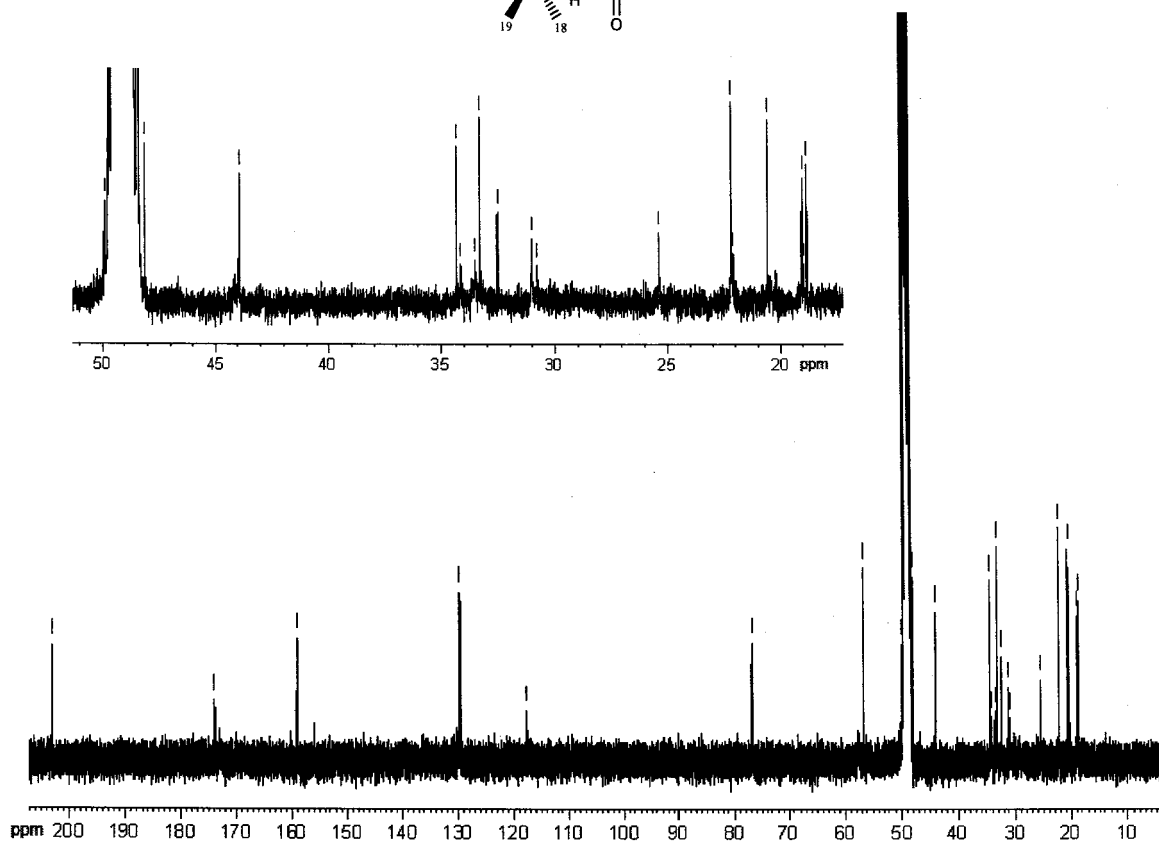
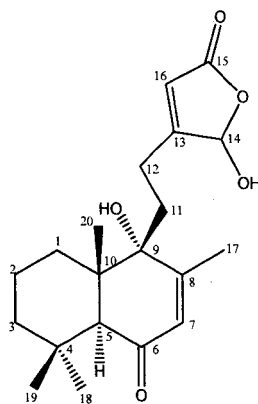
ANNEXE 2.**SPECTRES RMN DU SOLICANOLIDE**

¹H Solicanolide



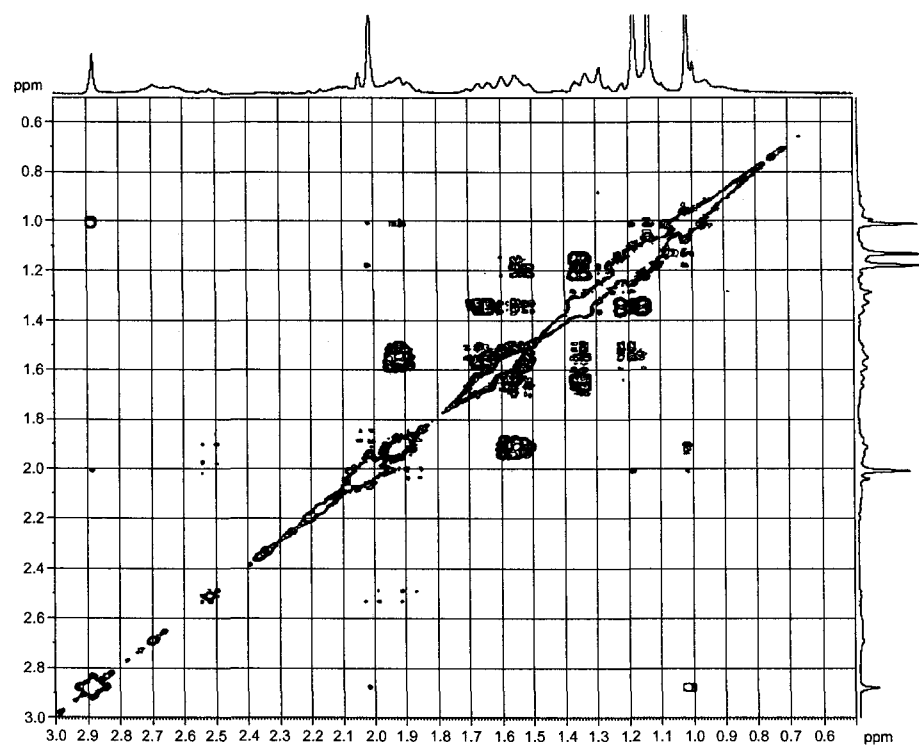
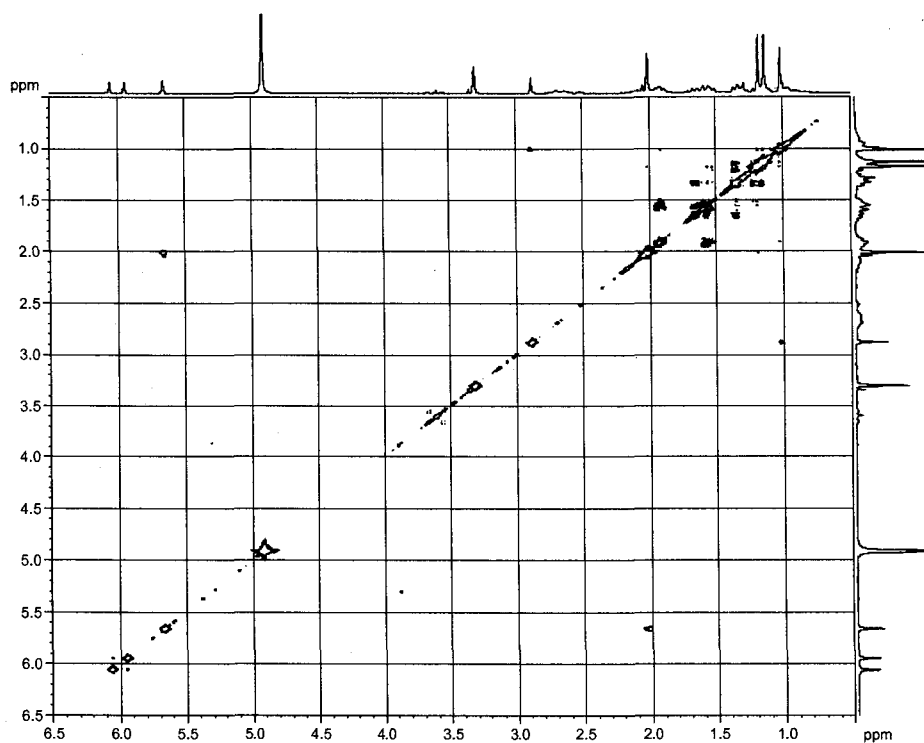
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 6.06 (1H, s, H-16), 5.95 (1H, s, H-14), 5.66 (1H, s, H-7), 2.88 (1H, s, H-5), 2.65 (1H, m, H-12), 2.11 et 1.94 (2H, m, H-11), 2.02 (1H, s, H-17), 1.92 et 1.57 (2H, m, H-1), 1.66 et 1.53 (2H, m, H-2), 1.35 et 1.19 (2H, m, H-3), 1.18 (1H, s, H-19), 1.14 (1H, s, H-18), 1.02 (1H, s, H-20).

^{13}C Solicanolide

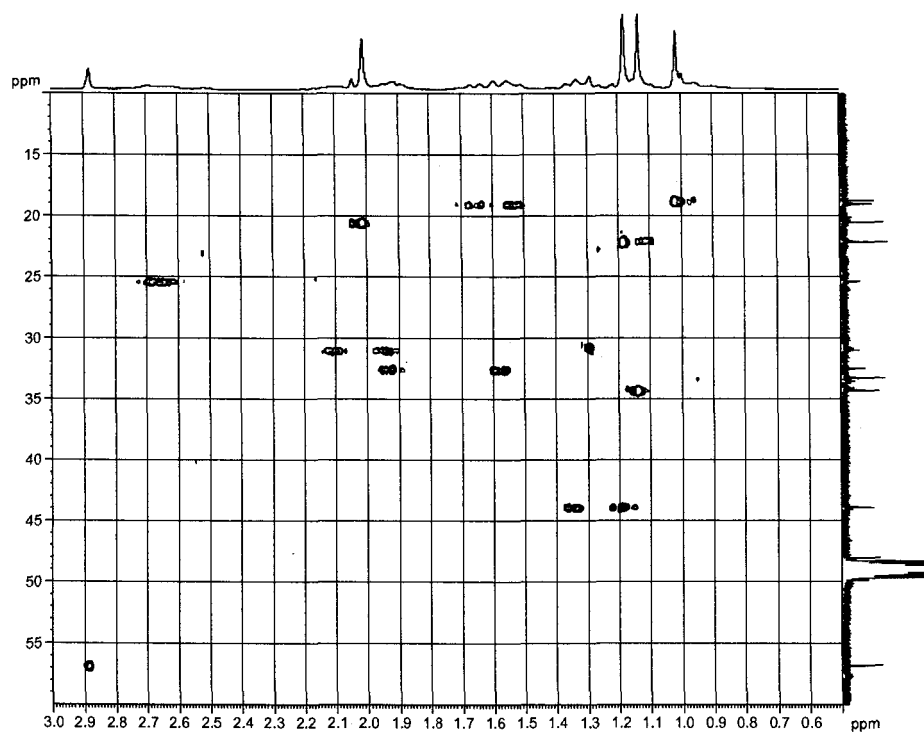
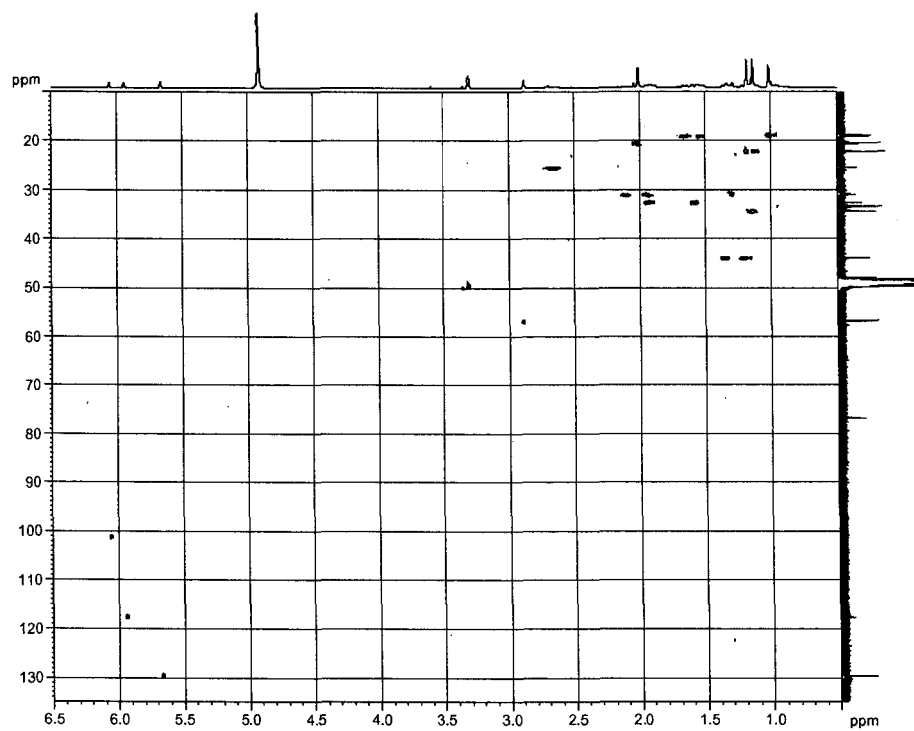


RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ 202.9 (6), 173.7 (15), 172.8 (13), 159.1 (8), 129.6 (7), 117.6 (14), 101.1 (16), 76.7 (9), 56.8 (5), 48.1 (10), 43.9 (3), 34.3 (18), 33.3 (4), 32.6 (1), 31.0 (11), 25.4 (12), 22.2 (19), 20.5 (17), 19.0 (2), 18.8 (20).

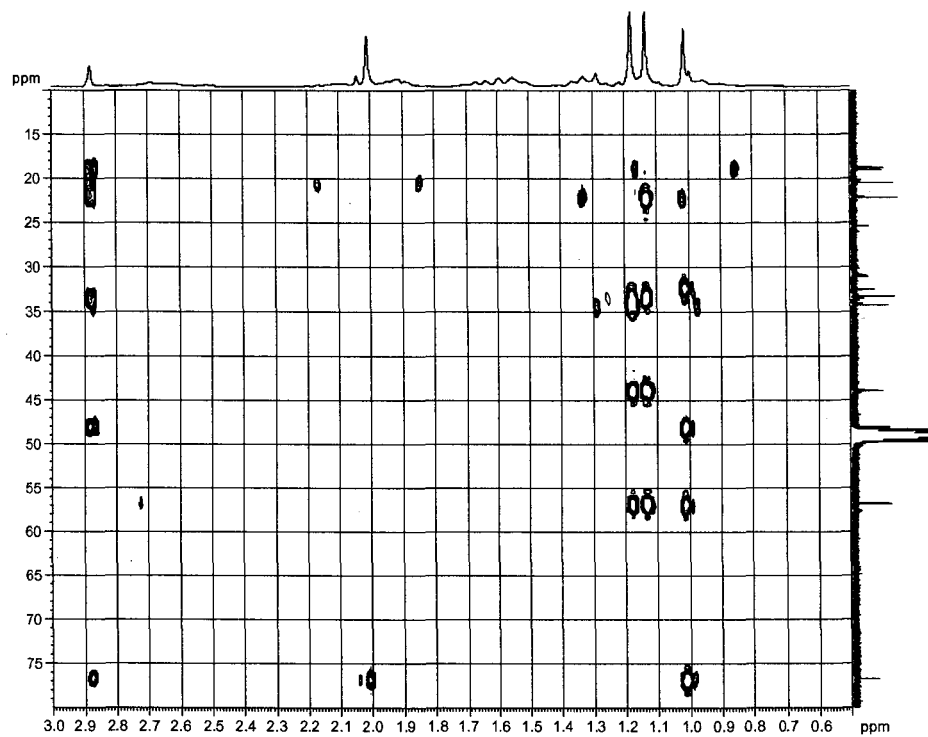
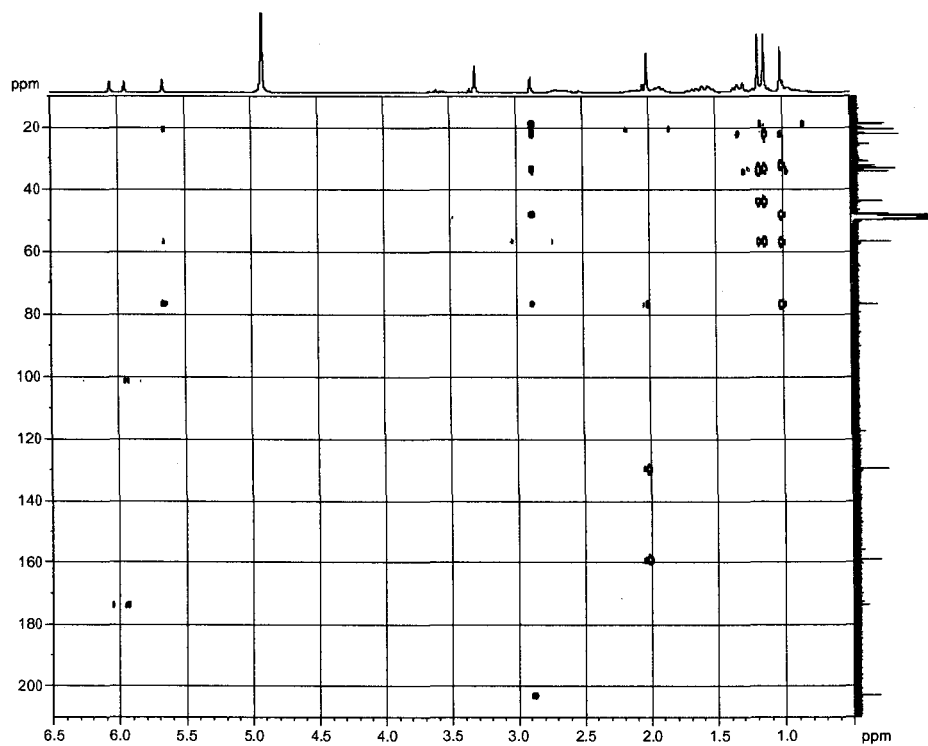
COSY Solicanolide



HSQC Solicanolide



HMBC Solicanolide



ANNEXE 3.**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DCFH-DA	<i>2,7-dichlorofluorescein-diacetate</i>
HMBC	<i>Heterocycle multiple bond correlation</i>
HR-ESI-MS	<i>High resolution electrospray ionisation mass spectra</i>
HSQC	<i>Heterocycle single quantum correlation</i>
IC₅₀	Concentration à laquelle il y a 50% d'inhibition
LPS	Lipopolysaccharide
MeOD	Méthanol deutéré
NO	<i>Nitric oxide</i>
ORAC	<i>Oxygen radical antioxidant activity</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TE	<i>Trolox equivalents</i>