

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

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

Par

Dominic Dufour

Évaluation de l'activité biologique du *Ledum groenlandicum* Retzius

2006



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

Les produits naturels sont reconnus depuis longtemps comme une source de médicaments importante. Par exemple, entre 1940 et 2002, 40% des nouveaux anticancéreux étaient d'origine naturelle ou dérivée de produit naturel. Jusqu'à maintenant moins de 10 % des espèces du règne végétal ont été testées pour leur activité biologique. La plupart des espèces végétales de la forêt boréale n'ont jamais fait l'objet d'études approfondies sur les produits naturels bioactifs. Pourtant, les amérindiens utilisaient plusieurs de ces plantes pour traiter des maux très variés. Le *Ledum groenlandicum* (*L. groenlandicum*) est une de ces espèces et était utilisé pour traiter différentes pathologies impliquant des mécanismes d'oxydation ou d'inflammation comme l'asthme, les rhumatismes et les brûlures. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote contribuent significativement à ces pathologies. Malheureusement, très peu d'études scientifiques ont été effectuées pour démontrer l'activité biologique de cette plante. Dans ce travail, les activités antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse d'extraits méthanoliques des branches et des feuilles de cette espèce ont été évaluées. Les deux extraits ont montré une activité antioxydante déterminée avec le test ORAC et un test sur cellule. De plus, les extraits ont démontré une activité anti-inflammatoire significative en inhibant le relâchement d'oxyde nitrique par 28% pour les tiges et par 17% pour les feuilles (25 µg/ml) dans les macrophages de souris (RAW 264.7) stimulé au LPS ce qui est comparable à l'effet du N-omega-nitro-L-arginine, un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthétase, à une dose similaire. L'extrait de branche a aussi démontré une activité anticancéreuse significative avec une IC₅₀ de 43±1 µg/ml sur les carcinomes du colon (DLD-1) et de 65±8 µg/ml sur l'adénocarcinome du poumon (A-549). Une isolation guidée par l'activité anticancéreuse a permis d'isoler un triterpène bien connu, l'acide ursolique. Cette molécule était active contre les DLD-1 (IC₅₀ : 9,3 ± 0,3 µM) et contre les A-549 (IC₅₀ : 8,9 ± 0,2 µM) suggérant qu'elle serait responsable, du moins en partie, de l'activité anticancéreuse de l'extrait de branches de *L. groenlandicum*.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur, le Dr Jean Legault, de m'avoir donné la chance de réaliser un projet dans un domaine qui ne m'était pas vraiment familier et dans lequel j'ai beaucoup appris. Je remercie également mon co-directeur, le Dr André Pichette, pour la partie plus "chimique" de mon projet. Par le fait même, des remerciements très importants vont à tout ceux qui ont patiemment répondu à mes questions dans mes moments d'ignorance de la chimie, et ce particulièrement à M. Serge Lavoie et au Dr Vakhtang Mshvildadze. Je me dois également de remercier Mme Marie-Eve Bradette-Hébert qui m'a assisté dans mes travaux pendant la session d'automne 2003. Biologiquement parlant, je remercie tout le personnel du laboratoire du Dr Legault pour les tests d'activités effectués et surtout Mme Angélique Longtin pour m'avoir appris à effectuer les tests d'activité anticancéreuse. Finalement, un merci spécial à ma famille, à Sara et à tous mes amis; après tout, ce sont eux qui nous soutiennent et nous permettent de nous changer les idées dans les moments difficiles.

Merci à tous!

Table des matières

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
INTRODUCTION	1
INTRODUCTION	2
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	13
PUBLICATION	14
RÉSUMÉ	15
ABSTRACT	18
1. INTRODUCTION	19
2. MATERIALS AND METHODS	20
2.1. Chemicals.....	20
2.2. Plant material and preparation of crude plant extract.....	20
2.3. Cell culture.....	21
2.4. Cytotoxicity assay	21
2.5. Measurement of the antioxidant activity.....	22
2.6. Total phenolic content.....	23
2.7. Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification	24
2.8. Isolation and identification of anticancer compound.	24
3.1. Yield and total phenolic content.....	26
3.2. Evaluation of in vitro and ex vivo antioxidant activity	26
3.3. Evaluation of the anti-inflammatory activity of methanol extracts on LPS-activated RAW 264.7 macrophages	27
3.4. Evaluation of cytotoxicity against tumor cell lines and identification of a bioactive compound.....	28
ACKNOWLEDGMENTS	32
REFERENCES	33
ÉTAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX	43
ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES EXTRAITS DE <i>L. GROENLANDICUM</i> ET IDENTIFICATION DU COMPOSÉ RESPONSABLE DE L'ACTIVITÉ, L'ACIDE URSOLIQUE.....	45
ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE <i>L. GROENLANDICUM</i> ET DE L'ACIDE URSOLIQUE	49
ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS DE <i>L. GROENLANDICUM</i>	50
ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE ET ANTIBIOTIQUE DES EXTRAITS DE <i>L. GROENLANDICUM</i>	51
REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE URSOLIQUE	51
CONCLUSION	62
PERSPECTIVES	66

BIBLIOGRAPHIE.....	69
PUBLICATION ET LIVRE	69
SITES INTERNET.....	75
ANNEXES	76

Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie et aire de distribution des espèces du genre <i>ledum</i> (USDA, GRIN database)	3
Tableau 2: Utilisation ethnopharmacologique <i>L. groenlandicum</i> (Moerman 2000)	6
Tableau 3 : Résultats des données RMN pour l'acide ursolique	79

Liste des figures

Figure 1 : <i>L. groenlandicum</i> (The Rook Family Home Page, 2004; Connecticut Botanical Society, 2004)	5
Figure 2 : Métabolisme de l'oxygène (Becker 2004)	8
Figure 3 : Production et signalisation associées au NO (Coleman 2001).....	10
Figure 4 : Acide ursolique	49
Figure 5 : Schéma expérimental menant à l'isolation de l'acide ursolique	50
Figure 6 : Spectre de résonance magnétique nucléaire proton d'un inconnu isolé du <i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	77
Figure 7 : Spectre de résonance magnétique nucléaire carbone d'un inconnu isolé du <i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	78
Figure 8 : Spectre de masse d'un standard d'acide ursolique.....	80
Figure 9 : Spectre de masse d'un inconnu isolé du <i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	81

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Introduction

La forêt boréale est l'une des ressources naturelles les plus importantes du Québec et au Canada. Cet écosystème, majoritairement constitué de conifères, occupe 71% de la superficie du Québec (Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune). L'industrie forestière exploite commercialement certaines de ces espèces (épinette noire et blanche, pin gris, etc.) lui permettant de générer une activité commerciale importante tout en employant plusieurs milliers de personnes. Malheureusement, cette industrie génère beaucoup de pertes de matériel végétal, autant lors des coupes (branchage, feuillage, écorce) qu'après celles-ci. Par exemple, lors de la régénération après coupe ou après feu, des espèces d'éricacées comme le kalmia et le thé du Labrador sont considérées comme nuisibles puisqu'elles compétitionnent avec le retour des espèces commerciales (Mallick 1995). Plusieurs recherches actuelles tentent de trouver des moyens (scarifiage par exemple) d'éradiquer les éricacées après coupe ou simplement d'empêcher leur retour. Cependant, il pourrait être intéressant de trouver de nouvelles voies de valorisation pour ces espèces. Il est d'ailleurs reconnu dans le monde scientifique que les produits d'origines naturelles sont une source importante d'agent thérapeutique. Par exemple, 40% des nouveaux anticancéreux découvert entre 1940 et 2002 était d'origine naturelle (Newman *et al.* 2003). De plus, plusieurs des plantes de la forêt boréale étaient utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour traiter une grande variété de pathologies (Moerman 2000).

Le Ledum groenlandicum Retzius (*L. groenlandicum*), communément appelé lédon du Groenland, thé du Labrador ou thé velouté, fait partie de la famille des éricacées. Le nom

Ledum groenlandicum Oeder est également souvent employé dans la littérature. Le département Américain de l'agriculture le classe dans le genre *Rhododendron* dans lequel la sous-section *ledum* comporte 23 espèces récemment regroupées en 9 espèces (Tableau 1). Par contre, cette classification n'est pas encore acceptée par tous.

Tableau 1: Taxonomie et aire de distribution des espèces du genre *ledum* (USDA, GRIN database)

Nom valide de la sous-section <i>Ledum</i> du genre <i>Rhododendron</i>	Ancien nom dans le genre <i>Ledum</i>	Aire de distribution connue
<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	<i>Ledum tomentosum</i> Stokes	Russie, Japon, Corée, Finlande, Suède, Autriche, Allemagne, Norvège, Pologne, Ukraine, Czechoslovaki, Biélorussie,
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>dilatatum</i> Wahlenb.	
	<i>L. palustre</i> L.	
<i>R. subarcticum</i> Harmaja	<i>L. palustre</i> L. ssp. <i>decumbens</i> (Ait.) Hultén	Russie (Sibérie est et ouest, Kamchatka, Magadan, Sakhalin), Japon, Corée, Canada, Alaska
	<i>L. decumbens</i> (Aiton) Lodd. ex Steud	
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>decumbens</i> Aiton	
<i>R. diversipilosum</i> (Nakai) Harmaja	<i>L. palustre</i> L. ssp. <i>diversipilosum</i> (Nakai) H. Hara	Russie (Sakhalin), Japon
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>diversipilosum</i> Nakai	
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>nipponicum</i> Nakai	
	<i>L. nipponicum</i> (Nakai) Tolm.	
<i>R. groenlandicum</i> (Oeder) Kron & Judd	<i>L. palustre</i> L. ssp. <i>groenlandicum</i> (Oeder) Hultén	Canada, USA
	<i>L. latifolium</i> Jacq.	
	<i>L. groenlandicum</i> Oeder	
<i>R. hypoleucum</i> (Kom.) Harmaja	<i>L. hypoleucum</i> Kom.	Russie (Khabarovsk, Kurile Islands, Primorye), Corée
<i>R. neoglandulosum</i> Harmaja	<i>L. glandulosum</i> Nutt.	Idaho, Montana, Oregon, Washington, Wyoming, Californie, Nevada, Utah, Colombie-Britannique
<i>R. subulatum</i> (Nakai) Harmaja	<i>L. subulatum</i> (Nakai) A.P.Khokhr. & Mazurenko	Est de la Russie, Chine, Corée
	<i>L. palustre</i> L. ssp. <i>angustissimum</i> Vorosch.	
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>angustum</i> E. Busch.	

	<i>L. palustre</i> L. var. <i>subulatum</i> Nakai	
<i>R. tolmachevii</i> Harmaja	<i>L. macrophyllum</i> Tolm.	Russie (Amur, Magadan, Sakhalin)
	<i>L. palustre</i> L. var. <i>yessoëns</i> Nakai	
<i>R. ×columbianum</i> (Piper) Harmaja Most probably <i>R. groenlandicum</i> × <i>R. neoglandulosum</i>	<i>L. columbianum</i> Piper	Colombie-Britannique, Californie, Oregon, Washington
	<i>L. glandulosum</i> Nutt var. <i>columbianum</i> (Piper) Hitchc.	

Le *L. groenlandicum* est un arbuste à tige ligneuse de 30 à 120 cm de hauteur, largement distribué dans la forêt boréale mais surtout retrouvé dans les milieux humides comme les tourbières à sphaigne. Il est également souvent associé à des peuplements ouverts et nordiques d'épinettes noires, d'épinettes blanches et de mélèzes. On le retrouve de l'Alaska au Groenland et il s'étend au sud jusqu'en Pennsylvanie (Tableau 1). La Flore Laurentienne (Marie-Victorin 1995) rapporte qu'il s'agit de la seule espèce de ce genre au Québec à l'exception du *Ledum decumbens* qu'on retrouverait dans la région de l'Ungava soit à l'extrême Nord de la province. En Amérique du Nord, on retrouve également le *Ledum columbianum* et le *Ledum glandulosum* sur la côte Ouest. Finalement, selon la nouvelle classification de la USDA, le *L. groenlandicum* est maintenant regroupé avec le *L. latifolium* Jacq. et le *L. palustre* L. ssp. *groenlandicum* (Oeder) Hultén pour ne former qu'une seule espèce. Malgré l'existence de cette nouvelle classification, le terme *Ledum groenlandicum* (*L. groenlandicum*) a été utilisé dans le texte.

On reconnaît le *L. groenlandicum* facilement par ses feuilles à bords révolutes, vertes du côté supérieur mais orangées et tomenteuses du côté inférieur (Marie-Victorin 1995), comme le montre la figure 1. Ses feuilles possèdent la caractéristique de persister plus d'un an, permettant ainsi à la plante de maximiser l'apport énergétique par une photosynthèse

débutant très tôt en saison estivale. La partie supérieure de sa tige grêle, brune rougeâtre et luisante est presque complètement obscurcie par un duvet brun-roux, tandis que la partie inférieure est glabre. Le *L. groenlandicum* fleurit pendant un mois, de fin mai à fin juin, et il produit des fleurs blanches hermaphrodites réunies en glomérules ombelliformes (Figure 1). Par contre, il se reproduit surtout de manière végétative (Jobidon 1995).



Figure 1 : *L. groenlandicum* (The Rook Family Home Page, 2004; Connecticut Botanical Society, 2004)

Le *L. groenlandicum* est une plante intolérante à l'ombre; il fait d'ailleurs souvent partie des premiers colonisateurs après un feu (Jobidon 1995). Small a aussi démontré que le *L. groenlandicum* était l'espèce utilisant le plus efficacement les ressources naturelles du milieu (Small 1972). Ceci lui procure un avantage compétitif qui se traduit souvent par une faible croissance des autres espèces présentes comme les jeunes épinettes noires. De plus, Inderjit et Malik ont montré que le *L. groenlandicum* contribue à modifier la chimie du sol ce qui pourrait inhiber selon eux la croissance et la régénération de l'épinette noire (Inderjit and Mallik 1996 ; Inderjit and Mallik 1997).

Dans la médecine traditionnelle amérindienne, le *L. groenlandicum* était couramment utilisé pour traiter une grande variété de malaise. Le Frère Marie-Victorin (Marie-Victorin 1995) fait d'ailleurs mention d'une utilisation trois fois par jour par la femme sur le point d'accoucher en tant que stupéfiant léger. Les utilisations les plus courantes, autres que la confection de thé par pratiquement toutes les tribus, sont listées dans le tableau 2.

Tableau 2: Utilisation ethnopharmacologique du *L. groenlandicum* (Moerman 2000)

Espèces	Partie de la plante utilisée et type de traitement	Problèmes traités	Tribus amérindiennes et références
<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Plante entière	Rhume	Micmac (Chandler <i>et al.</i> 1979), Abnakis (Rousseau 1947), Kitasoo, Haisla, Hanaksiala, Oweekeno (Compton 1993)
		Troubles nasales	Abnakis (Rousseau 1947)
	Infusion plante entière	Mal de tête et en tant que tonic	Algonquins (Black 1980)
		Mal de reins	Malecite (Mechling 1959), Okanagan (Turner <i>et al.</i> 1990)
		Goutte	Montagnais (Speck 1917)
	Poudre de racine	Brûlures et ulcères	Chippewas (Densmore 1928)
	Infusion de feuilles	Tuberculose	Haisla et Hanaksiala (Compton 1993)
		Mal d'estomac	Bella Coola (Smith 1929)
		Utilisée comme diurétique	Cree (Beardsley 1941), Micmac (Speck 1917)
		Mal de reins; avec du sucre pour donner de la vigueur après l'accouchement	Makah (Gill 1983)
		Pour purifier le sang	Makah (Gunther 1973), Montagnais (Speck 1917)
		Mal de gorge	Oweekeno (Compton 1993)
	Infusion de bourgeons	Piqûres d'insecte, rhumatismes et en tant que traitement orthopédique	Cree de la Baie d'Hudson (Holmes 1884)
	Bois bouilli	Traitement dermatologique	
	Feuilles fraîches mâchées	Blessures diverses	
	Emplâtre de feuilles	Brûlures et en tant qu'émétique	Cree (Beardsley 1941)
		Trouble des seins, des brûlures et associé à de	Cree (Leighton 1985)

		l'huile de poisson pour la cicatrisation du cordon ombilical	
	Emplâtre de plante entière	Fièvre	Montagnais (Speck 1917)
	Décoction de plante entière	Traitement dermatologique	Cree (Leighton 1985), Shuswap (Palmer 1975)
		Pneumonie et en tant que traitement pulmonaire	Cree (Leighton 1985)
		Troubles de la vision	Shuswap (Palmer 1975)
	Décoction de feuilles et de petites branches	Pour augmenter l'appétit	Haisla et Hanaksiala (Compton 1993), Nitinaht (Gill 1983)
	Feuilles	Asthme	Micmac (Speck 1917)
		En tant que narcotique	Kwakiutl (Turner et Bell 1973)
	Infusion ou emplâtre de plante entière	Jaunisse	Montagnais (Speck 1917)

Plusieurs tribus amérindiennes utilisaient le *L. groenlandicum* pour traiter des pathologies impliquant un processus inflammatoire comme les brûlures, les rhumatismes, l'arthrite et l'asthme. L'inflammation est un processus très bien orchestré qui fait partie des mécanismes de défense naturels. Le rôle de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur, de stopper l'atteinte tissulaire et, par la suite, de rétablir l'homéostasie et la fonction du tissu. Cependant, dans certaines circonstances, l'équilibre homéostatique est rompu entraînant une anarchie dans la réparation et, par la même occasion, une chronicité de l'inflammation de même qu'une atteinte fonctionnelle du tissu. Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), générés par les macrophages activés, sont en partie responsables de l'altération tissulaire (Bauerova and KBezek 1999; Rahman 2002; Horton 2003). Le paragraphe suivant décrit les principaux ROS et RNS ainsi que leur toxicité.

Les ROS sont constamment produit par le métabolisme cellulaire, surtout dans les mitochondries. Environ 95 % de l'oxygène consommé par la respiration cellulaire est réduite en eau alors que le 5 % restant est transformé en ROS (Figure 2) (Becker 2004).

Comme le montre la figure 2, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est l'un des premiers ROS produit. En temps normal, l'anion superoxyde est en équilibre avec sa forme protonée (HO_2) qui peut engendrer des dommages aux acides gras et à la membrane cellulaire lorsqu'il se retrouve en excès. Ces dommages sont prévenus par la superoxyde dismutase qui transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Alors que la catalase et le glutathion peroxydase détoxifient le peroxyde d'hydrogène en eau. Par contre, dans certaines circonstances, l'homéostasie est rompue et le système antioxydant endogène n'arrive plus à éliminer la totalité des ROS formés induisant ainsi une augmentation de la concentration de ceux-ci. Dans ces conditions de stress oxydatif, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec des ions métalliques (Fe, Cu) par la réaction de Fenton pour produire le radical hydroxyl ($\cdot OH$). Ce dernier réagit directement au site de formation avec les biomolécules tel que l'ADN, les lipides et les protéines (Figure 2) (Becker 2004).

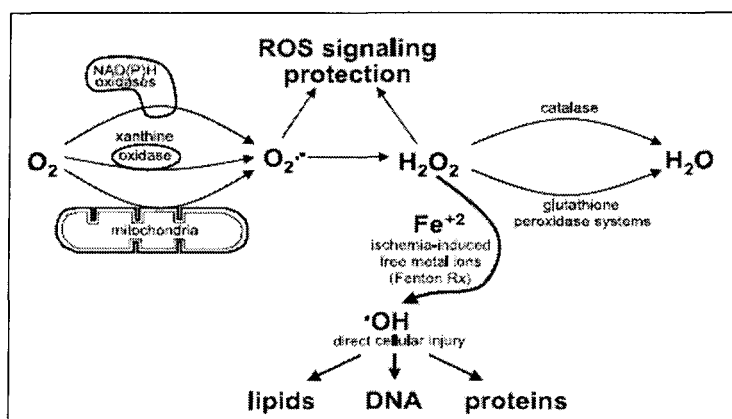
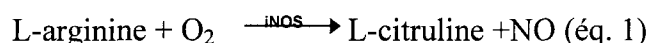


Figure 2 : Métabolisme de l'oxygène (Becker 2004)

Les RNS sont quant à eux engendrés à partir de l'oxyde nitrique (NO). Le NO est une molécule importante qui est produite par différents types cellulaires (neurones, cellules

endothéliales, etc.). Il joue un rôle dans la signalisation cellulaire et dans le système immunitaire en tant qu'agent cytotoxique en engendrant des effets toxiques sur les organismes infectieux comme les bactéries ou en régulant la mort des cellules hôtes affectées. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine et de l'oxygène moléculaire (éq. 1) via une réaction catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) :



Le NO est constamment produit par la NOS-1 (nNOS) et la NOS-3 (eNOS) souvent en réponse à une augmentation de la concentration de calcium comme c'est le cas à l'arrivée d'un potentiel d'action. Lors des réponses immunitaires, la NOS inducible (iNOS ou NOS-2), induit la production d'une grande quantité de NO. À haute concentration, celui-ci est rapidement oxydé pour produire des RNS comme le dioxyde d'azote (NO₂), le trioxyde de diazote (N₂O₃) et le tetraoxyde de diazote (N₂O₄). Certains des RNS formés sont très instables et toxiques pour les cellules (Coleman 2001). Ultimement, le NO et le O₂^{•-} peuvent aussi réagir ensemble pour donner le peroxynitrite (ONOO^{•-}) qui est un oxydant très réactif qui contribue à la dégradation des tissus dans les processus inflammatoires chroniques (Szabo 2003). En effet, cet oxydant agit à différents niveaux comme par exemple en inhibant les enzymes antioxydantes, en dégradant l'ADN et ultimement en causant l'apoptose (Szabo 2003). Le glutathion (GSH) est l'antioxydant le plus important contre les RNS alors qu'elle réagit avec ceux-ci pour générer la S-nitrosoglutathion (GS-NO) qui joue ainsi un rôle de réservoir de NO (Coleman 2001). La figure 3 résume la production et les voies de signalisation cellulaire associées au NO.

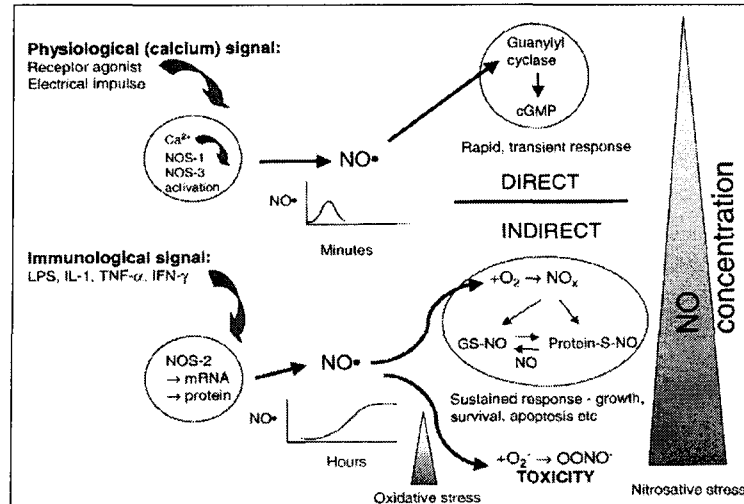


Figure 3 : Production et signalisation associées au NO (Coleman 2001)

En temps normal, les RNS et les ROS sont essentielles au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Ils sont normalement éliminés sans causer de dommages aux tissus. Malheureusement, lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité, les ROS et les RNS deviennent nuisibles en causant un stress oxydatif (Turrens 2003). Le stress oxydatif peut se traduire par une oxydation des biomolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN (Halliwell *et al.* 1995). Les maladies inflammatoires chroniques comme les rhumatismes, l'asthme et les brûlures sont connues pour générer des ROS et RNS en plus grande quantité (Bauerova and KBezek 1999; Rahman 2002; Horton 2003).

Une diminution du système antioxydant cellulaire laisse donc le champ libre à tous ces agents oxydants qui peuvent provoquer plusieurs problèmes de santé reliés à l'inflammation et à l'oxydation. Il a été démontré par plusieurs chercheurs que des molécules antioxydantes ou anti-inflammatoires pouvaient contribuer au traitement de pathologies comme l'asthme, les brûlures et les rhumatismes. Ces molécules peuvent agir

en inhibant la formation de l'anion superoxyde, de l'oxyde nitrique et par conséquent du peroxydazote (Bauerova and KBezek, 1999; Rahman, 2002; Horton, 2003). Il est possible de vérifier de manière expérimentale la capacité antioxydante ou anti-inflammatoire d'une molécule. Brièvement, la capacité antioxydante est vérifiée par un test chimique (ORAC) dans lequel on mesure la capacité d'une molécule à réduire l'oxydation d'une sonde fluorescente résultant en une baisse de fluorescence (Ou *et al.* 2002). La capacité antioxydante peut également être mesurée sur des cellules en incubant celles-ci en présence de DCFH-DA et en quantifiant l'inhibition de son oxydation par le tBH (Legault *et al.* 2003). Pour l'activité anti-inflammatoire, on peut mesurer l'inhibition du relâchement de NO induit par des macrophages stimulés par le LPS (Green *et al.* 1990).

Peu d'études scientifiques ont été effectuées pour démontrer l'efficacité du *L. groenlandicum* contre l'inflammation et l'oxydation. Cependant, l'équipe d'Owen s'est penchée sur le *L. groenlandicum* en testant la capacité d'inhibition de la xanthine oxydase par des plantes traditionnellement utilisées contre la goutte. Les feuilles de *L. groenlandicum* se sont avérées très efficaces, avec une inhibition d'environ 50 % à une concentration de 100 µg/ml. Cette inhibition serait due aux tanins qui sont connus pour avoir la capacité de se lier non spécifiquement aux enzymes et ainsi les inhiber (Owen and Johns 1999). Ceci concorde avec les travaux de Pieroni qui utilise le *L. groenlandicum* en tant que témoin positif contre l'inhibition de la xanthine oxydase et la peroxydation lipidique (Pieroni *et al.* 2002). On retrouve également très peu d'information sur la composition chimique et les autres activités du *L. groenlandicum*. La composition chimique

de l'huile essentielle de cette espèce est connue. En effet, les travaux de maîtrise de Belleau ont montré que le sabinène, l' α - et β -pinène, l' α -humulène, l' α - et β -sélinène, le germacrène-B et le germacrone sont les produits majeurs présents dans l'huile essentielle de *L. groenlandicum* (Belleau 1990). Cette huile essentielle possède d'ailleurs la propriété de réduire le nombre de mutations induites par l'uréthane dans les ailes de *Drosophila melanogaster* lors du test de mutation somatique (SMART) (Idaomar *et al* 2002). De plus, la forte concentration de tanins éloignerait les insectes herbivores selon l'étude de Reader (Reader 1978). Considérant le peu d'études réalisées sur le *L. groenlandicum*, il est pertinent d'évaluer l'activité biologique et la composition chimique de cette espèce, notamment l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

Problématique et Objectifs

Des problèmes de santé publique important liés à des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme et l'arthrite sont de plus en plus présents dans notre société. Toutes ces maladies impliquent un processus inflammatoire dans lequel l'oxydation des biomolécules est impliquée. Les amérindiens utilisaient plusieurs plantes pour traiter des pathologies impliquant un processus pro-inflammatoire tel que le *L. groenlandicum*. Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur l'activité biologique de cette espèce. L'objectif principal de ce travail de recherche était d'étudier l'activité biologique du *L. groenlandicum*. Les objectifs spécifiques de ce travail de recherche visaient à évaluer : (i) l'activité antioxydante du *L. groenlandicum* à l'aide de deux tests soit le test ORAC et un essai cellulaire; (ii) l'activité anti-inflammatoire sur un modèle de macrophage stimulé au LPS; (iii) diverses activités antiproliférative comme l'activité anticancéreuse, antifongique et antibiotique et finalement; et (iv) à identifier des composés responsables des activités biologiques

CHAPITRE 2

PUBLICATION

Résumé

Le thé du Labrador (*Ledum groenlandicum* Retzius) est une espèce d'éricacée largement distribuée en Amérique du Nord. Les feuilles et la tige de cette plante étaient utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour traiter diverses pathologies impliquant de l'inflammation telles que l'asthme, les rhumatismes et les brûlures. Les radicaux libres oxygénés et azotés comme l'oxyde nitrique contribueraient significativement à ces pathologies. Les activités antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse ont été évaluée pour les extraits méthanoliques des feuilles et des branches de thé du labrador. Il s'est avéré que les feuilles et les branches montraient une bonne activité antioxydante lors du test ORAC avec des valeurs de 16 ± 2 et 20 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ respectivement. Un test sur cellule renforce ce résultat avec une inhibition de l'oxydation du DCFH induite par le tBH de 73% pour les feuilles et de 78% pour les branches à une concentration de $0,1 \mu\text{g/ml}$. D'un autre côté, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages de type 264,7 stimulés au LPS. L'inhibition était de 28% pour les branches et de 17% pour les feuilles ce qui est comparable à l'inhibition de 24% produite par la N-omega-nitro-L-arginine, un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthétase. L'extrait de branche a aussi démontré une activité anticancéreuse intéressante avec un IC_{50} de 43 ± 1 $\mu\text{g/ml}$ sur les carcinomes du colon (DLD-1) et de 65 ± 8 $\mu\text{g/ml}$ sur l'adénocarcinome du poumon (A-549). Une isolation guidée par l'activité anticancéreuse a permis d'isoler un triterpène bien connu, l'acide ursolique. Cette molécule était active contre les DLD-1 (IC_{50} : $9,3 \pm 0,3$ μM) et contre les A-549 (IC_{50} : $8,9$

$\pm 0,2 \mu\text{M}$) suggérant qu'elle serait responsable, du moins en partie, de l'activité anticancéreuse de l'extrait de branches de *L. groenlandicum*.

Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius

Dominic Dufour^a, André Pichette^a, Vakhtang Mshvildadze^a, Marie-Eve Bradette-Hébert^a,
Serge Lavoie^a, Angélique Longtin^a, Catherine Laprise^{b,c} et Jean Legault^{a,*}

^a Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Qué., Canada.

^b Université du Québec à Chicoutimi, Département des Sciences Fondamentales,
Chicoutimi, Qué., Canada.

^c University of Montreal Community Genomic Medicine Center, Chicoutimi University
Hospital, Saguenay, Canada.

Keywords : *Ledum groenlandicum* Retzius, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, ursolic acid

*Address reprint requests to Dr J. Legault

Université du Québec à Chicoutimi
555, boulevard de l'Université
Chicoutimi, Québec, Canada
G7H 2B1
Tel. 00 1 (418) 545-5011. Fax : 00 1 (418) 545-5012.
E-mail : Jean_Legault@uqac.ca

Abstract

Labrador tea (*Ledum groenlandicum* Retzius) is an ericaceae widely distributed in North America. The leaves and twigs were used in Native American traditional medicine to treat several inflammatory pathologies such as asthma, rheumatisms and burns. Reactive oxygen species as well as reactive nitrogen species such as nitric oxide (NO) contribute significantly to these pathologies. In this study, the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of crude methanol extracts of leaves and twigs from *L. groenlandicum* were investigated. Both extracts showed a strong antioxidant activity using the ORAC method and a cell based-assay. Moreover, the twig and leaf extracts showed significant anti-inflammatory activity, inhibiting NO release respectively by 28% and 17% at 25 $\mu\text{g/ml}$ in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. In comparison, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, reduced NO release by 24% at 25 $\mu\text{g/ml}$. The twig extract was also found to be active against DLD-1 colon carcinoma and A-549 lung carcinoma cells, with IC_{50} values of 43 ± 1 and 65 ± 8 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The bioguided study of the twig extract resulted in the isolation and identification of ursolic acid, a known triterpene. Ursolic acid was active against DLD-1 (IC_{50} : 9.3 ± 0.3 μM) and A-549 (IC_{50} : 8.9 ± 0.2 μM), suggesting it is, in part, responsible of the anticancer activity of the twig extract.

1. Introduction

Ledum groenlandicum Retzius (Labrador tea) is an ericaceae widely distributed in North America. It grows from Alaska to Groenland and spreads south to Pennsylvania. It is a 30 to 120 cm high shrub with densely tomentose twigs. The underside of the leaves is also covered with brown hairs (Frère Marie-Victorin, 1995). *L. groenlandicum* is commonly associated with moss covered wet substrate or with open populations of black and white spruce or larch (Jobidon 1995). Leaf infusions were often used as a beverage. Leaves and twigs were used in Amerindian traditional medicine to treat several pathologies such as inflammatory diseases (Rousseau, 1947; Moerman 2000), asthma (Chandler et al., 1979), rheumatisms (Gunther, 1973), burns (Leighton, 1985) and diseases of the liver (Burgesse, 1944) and kidney (Chandler et al, 1979; Turner et al., 1980). In spite of the very widespread use of *L. groenlandicum*, few studies were carried out to support its ethnopharmacological use.

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and hypochlorous acid, as well as reactive nitrogen species (RNS), such as nitric oxide and peroxynitrite, contribute significantly to tissue injury in asthma, rheumatisms and burns (Bauerova and KBezek, 1999; Andreadis et al., 2003; Horton, 2003). Moreover, several studies suggest that antioxidant and anti-inflammatory agents could be beneficial in the prevention and treatment of these pathologies (Bauerova and KBezek, 1999; Rahman I, 2002; Horton, 2003).

In this study, we investigated *L. groenlandicum* leaf and twig methanol extracts for their antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The solvents were purchased from EMD (Canada). The TLC plates (glass sheets of silica gel ultra pure 250 μm for analytical and 1000 μm for preparative, with indicator F-254) and silica gel ultra pure (40-63 μm) were supplied by Silicycle (Québec, Canada). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Plant material and preparation of crude plant extract

All *L. groenlandicum* specimens were harvested in July 2004 near lake des Ilets in the Réserve faunique des Laurentides, Quebec (48°12' N 71°14' W), Canada. The specimens were identified by Patrick Nadeau (Department of Fundamental Sciences; Université du Québec à Chicoutimi). Voucher specimen No QFA-492116 has been deposited at the Louis-Marie Herbarium of Laval University, Quebec, Canada. Leaves and twigs were separated, dried at room temperature and powdered. Powdered leaves or twigs (200g) were then extracted in one liter of methanol under reflux for two hours. Afterwards,

the extracts were filtered, dried with MgSO_4 and filtered again to eliminate the MgSO_4 . The crude methanol extracts were concentrated under vacuum and finally freeze-dried.

2.3. Cell culture

The human lung carcinoma A-549 (ATCC #CCL-185), colon adenocarcinoma DLD-1 (ATCC #CCL-221), murine fibrosarcoma L-929 (ATCC #CCL-1) and murine macrophage RAW 264.7 (ATCC #TIB-71) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The A-549, DLD-1, L-929 cell lines were grown in Minimum Essential Medium with Earle's salts, while the RAW 264.7 cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Mediatech Cellgro®, Herndon, USA). Both media were supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), solution of vitamins (1X), sodium pyruvate (1X), non-essential amino acids (1X), penicillin (100 IU) and streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO_2 .

2.4. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated at a density of 5×10^3 cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning inc.) in 100 μl of culture medium and were allowed to adhere for 16 hours before treatment. Then, 100 μl of increasing concentrations of extract or pure compounds dissolved in the appropriate solvent (Sigma-Aldrich) were added. The

final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (volume/volume) to avoid solvent toxicity. The cells were incubated for 48 h in the absence or in the presence of extract. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test as described by O'Brien (O'Brien et al., 2000). Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration of extract or compound inhibiting cell growth by 50% (IC₅₀).

2.5. Measurement of the antioxidant activity

2.5.1 ORAC_{FL} assay

The procedure was modified from the method described by Ou et al. (2001). Briefly, the ORAC assay was carried out on a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems). Trolox was used as a control standard. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 30 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. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram (μmol TE/mg).

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

Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Legault (Legault, et al., 2003), with some modifications. Briefly, L-929 cells were plated in 96 microwell plates at 10,000 cells per well and incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. The cells were washed with 150 µl Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and incubated for 30 minutes with 100 µl HBSS (pH 7.4) containing 5 µM DCFH-DA (Sigma-Aldrich). The cells were then washed again with 150 µl HBSS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated either with a growing concentration of methanol extract from *L. groenlandicum*, trolox or quercetin, in the absence or presence of 200 µM tert-butylhydroperoxide (tBH). Fluorescence was measured after 1 h and 4 h on the automated 96-well plate reader (Fluoroskan Ascent FLTM, Labsystems) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Student T-tests corroborated with Wilcoxon-Mann-Whitney U-tests were used to determine significant differences.

2.6. Total phenolic content

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent according to the procedure reported by Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Briefly, a volume of 50 µl containing growing concentrations of extract ranging from 0.39 to 50 mg/ml were mixed with 25 µl of a Folin-Ciocalteu reagent in 96-well plates. After 2 minutes, 125 µl of sodium bicarbonate solution (0.27 g/ml) was added

to each well. The plate was shielded from the light and stored for 2 h at room temperature. Its absorbance was then measured at 758 nm using an automated 96-well Varioskan Ascent plate reader (Thermo Electron). Analysis was performed in triplicate, and the results were expressed in tannic acid equivalents.

2.7. Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification

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), or increasing concentrations of methanol extracts 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% (volume/volume) to avoid solvent toxicity. Cells were then stimulated with 100 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS). After 24 h, cell-free supernatants were collected and stored at -80 °C until NO determination using the Griess reaction (Green et al. 1990) with minor modifications. Briefly, 100 μ l aliquots of cell supernatants were incubated with 50 μ l of 1% sulfanilamide 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.

2.8. Isolation and identification of anticancer compound.

Powdered twigs (100 g) were consecutively extracted using soxhlet with 750 ml of hexane, diethyl ether and methanol. Anticancer activities of each extract were tested. The active diethyl ether extract was separated by preparative TLC using chloroform:ethanol 10:1. Eleven bands were collected and tested against cancer cells. The most active fraction (band 3) was separated by TLC analysis using chloroform:ethanol 20:1 as eluant and sulfuric acid 20% in methanol as developer. The pink coloring of the main compound in the fraction suggested a triterpene (Mshvildadze et al., 2004). To isolate this compound, the diethyl ether extract (6.62 g) was separated by silica gel column using as eluant chloroform (4 L), chloroform:methanol 90:1 (2.7 L) and chloroform:methanol 80:1 (2.8 L). The fractions containing active compound were combined and evaporated using a rotative evaporator to obtain a green solid (560 mg) and then purified with activated coal to eliminate residual chlorophyll. The remaining yellow solid (239 mg) was separated by preparative TLC using chloroform:ethanol 40:1 as eluant to obtain pure compound (13 mg). The pure compound was identified using NMR and MS spectra. A Bruker Avance spectrometer (^1H at 400.13 MHz; ^{13}C at 100.61 MHz) equipped with a 5 mm QNP-probe was used for NMR experiments (^1H and ^{13}C , DEPT 135 and DEPT 90, HSQC, HMBC, COSY, TOCSY and NOESY). GC-MS analysis were performed on a Hewlett-Packard mass spectrometer 5972 at 70 eV coupled to an HP 5890 equipped with a DB-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Temperature program was 100 °C for 1 min, then 25 °C/min to 280 °C and 5 °C/min to 325 °C and held constant for 30 min. Samples were methylated with freshly prepared diazomethane prior to injection.

3. Results and Discussion

3.1. Yield and total phenolic content

As shown in Table 1, the methanol extraction yields of leaves and twigs were of 0.12 g/g of dried biomass. The total phenolic content of both extracts was assessed using the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). The results presented in Table 1 indicate that the methanolic extracts of leaves and twigs contain high concentrations of phenolic compounds, with respectively 0.20 and 0.39 g/g of extract.

3.2. Evaluation of *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity

In previous studies, it was reported that an extract of *L. groenlandicum* leaves possessed some indirect antioxidant activity since it inhibits the xanthine oxydase (Owen and Johns 1999). This was probably due to the presence of tannins (Owen and Johns 1999). However, no direct antioxidant activity has been shown for *L. groenlandicum* extracts. The antioxidant activity of methanol extracts of leaves and twigs was assessed *in vitro* using the ORAC assay (Ou et al., 2001). In Table 1, the results indicate that both extracts were strongly antioxidant, with ORAC values respectively of 16 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ for leaves and 20 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ for twigs. In comparison, the ORAC values of standard phenolic compounds were 13 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ for gallic acid and 31 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ for quercetin. The antioxidant activity of both extracts was also assessed *ex vivo* using a cellular based-

assay (Legault et al., 2003). Results presented in Figure 1 show that 0.1 µg/ml of methanol leaf extract inhibited the tBH-induced oxidation of DCFH by 73%, while the methanol twig extract inhibited this oxidation by 78%. In comparison, Trolox (0.25 µg/ml), a water-soluble vitamin E derivative, and quercetin (0.25 µg/ml) inhibited DCFH oxidation by 42% and 82% respectively. These results show that both extracts possess a strong *ex vivo* antioxidant activity. This is possibly due to the presence of phenolic compounds. These results support the ethnopharmacological use of *L. groenlandicum* in pathologies implicating ROS.

3.3. Evaluation of the anti-inflammatory activity of methanol extracts on LPS-activated RAW 264.7 macrophages

A variety of *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that several phenolic compounds possess anti-inflammatory activities (Middleton, 1998). Phenolic compounds have been reported to be beneficial in the treatment of chronic inflammatory diseases associated with overproduction of nitric oxide (NO) (Jiang and Dusting, 2003). In the inflammation process, NO is produced from L-arginine by the inducible NO synthase (iNOS). Peroxynitrite, formed by the rapid reaction between superoxide and NO, is a toxic substance that contributes to tissue injury in inflammatory diseases (Szabo, 2003).

The presence of phenolic compounds in *L. groenlandicum* extracts prompted us to investigate their anti-inflammatory activity. Anti-inflammatory activity was evaluated using

LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Stimulation of RAW 264.7 macrophages by LPS induces iNOS and overproduction of NO. NO released from cells can be detected and quantified photometrically as its stable product, nitrite, by a simple colorimetric reaction 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. Results presented in Figure 2 show that L-NAME (25 µg/ml) significantly inhibited NO release by 24%. Both methanol extracts significantly inhibited NO release in a dose-dependant manner at concentrations ranging from 1.5 to 100 µg/ml. The twig extract (28% inhibition) was found to be more active than leaf extract (17% inhibition) at 25 µg/ml. The anti-inflammatory activity could be due, in part, to the presence of phenolic compounds in the extracts. Cytotoxicity of leaf and twig extracts was also evaluated towards RAW 264.7 cells. Both extracts were not found to be significantly cytotoxic at doses ranging from 1.5 to 100 µg/ml (data not shown). Altogether, these results support the ethnopharmacological use of *L. groenlandicum* in the treatment of inflammation diseases implicating NO and peroxynitrite.

3.4. Evaluation of cytotoxicity against tumor cell lines and identification of a bioactive compound

The anticancer activity of *L. groenlandicum* has not been shown in literature. However, two quercetin glycoside derivatives isolated from leaves of *Ledum palustre* were found to be cytotoxic against human mouth epidermal carcinoma (KB) (Jin et al., 1999).

The anticancer activity of both methanol extracts was evaluated against colon carcinoma cell line DLD-1 and lung carcinoma cell line A-549. As shown in Figure 3A, the methanol leaf extract was inactive against DLD-1 and A-549 with an IC_{50} value higher than 100 $\mu\text{g/ml}$. In contrast, the results presented in Figure 3B show that the methanol twig extract was active against DLD-1 and A-549, with IC_{50} value of 43 ± 1 and 65 ± 8 $\mu\text{g/ml}$ respectively. In order to isolate and identify the bioactive compound responsible for the anticancer activity, the twigs were extracted successively with hexane, diethyl ether and methanol and the cytotoxicity of each extract was assessed against DLD-1 and A-549. Only the diethyl ether extract was significantly active against both cell lines (data not shown). The bioguided isolation of the major active compound in the diethyl ether extract was carried out using a silica gel column and a preparative thin layer chromatography plate (PTLC). NMR and MS analysis allowed to identify the pure isolated compound. The analysis of NMR spectra DEPT 135 and ^{13}C analysis revealed 30 carbons including seven methyls, ten methylenes, six methines and six quaternary carbons. Moreover, NMR spectra indicate that the double bond was trisubstituted. Altogether, these results suggest that the compound was a triterpene. The presence of five singlets methyl and two doublet one's suggests that the compound belongs to the ursane family. Finally, comparison of the NMR spectra with the literature allowed us to identify the compound as being ursolic acid (Kriwacki *et al.* 1989).

Ursolic acid is a known compound found in numerous plants. However, it is the first time that ursolic acid is reported in *L. groenlandicum* twigs. It is known to have several

pharmacological uses, including antibacterial (Collins and Charles 1987), anti-inflammatory (Fan *et al.* 2004), analgesic (Costa *et al.* 2003), antifeedant (Chandramu *et al.* 2003), antidiabetic (hypoglycaemic) (Basnet *et al.* 1993), anti-ulcer (Gupta *et al.* 1981) and hepatoprotector activities (Shukla *et al.* 1992). Moreover, ursolic acid contributes to the anticancer activity of some plants such as *Oldenlandia diffusa* (Kim *et al.* 1998) and *Hedyotis corymbosa* L. (Hsu *et al.* 1997). In Japan, it has been recommended to treat skin cancer. (Muto *et al.* 1990). Ursolic acid was also found to be active against colon carcinoma cell lines HCT15 and HT29 (Li *et al.*, 2002; Andersson *et al.* 2003). In this study, the anticancer activity of ursolic acid was assessed against DLD-1 and A-549 cell lines. As shown in Figure 4, ursolic acid was strongly active against DLD-1 and A-549, with IC_{50} of $9.3 \pm 0.3 \mu M$ and $8.9 \pm 0.2 \mu M$ respectively. Interestingly, ursolic acid was more active against DLD-1 than standard 5-fluorouracil (IC_{50} : $18 \pm 3 \mu M$), a chemiotherapeutic agent used against colon tumors. Altogether, these results suggest that ursolic acid is, in part, responsible for the anticancer activity of *L. groenlandicum* extracts. Moreover, ursolic acid could contribute to the anti-inflammatory activity of *L. groenlandicum* twig extracts. Indeed, ursolic acid isolated from *Prunella vulgaris* strongly inhibited nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages (Ryu *et al.*, 2000), and have also been long-recognized as having anti-inflammatory and antihyperlipidemic properties in laboratory animals (Liu, 1995).

In summary, this study shows that *L. groenlandicum* extracts possess antioxidant and anti-inflammatory activities, which supports its ethnopharmacological use. Moreover,

L. groenlandicum twig extracts were found to be active against lung and colon carcinoma cell lines. Ursolic acid was isolated and identified for the first time from *L. groenlandicum* twigs and could contribute to the anti-inflammatory and anticancer activities of the extract.

Acknowledgments

We thank F-I. Jean and H. Gagnon for help and suggestions. The authors would like to thanks Patrick Nadeau for plant identification. C. Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair for genetic determinants in asthma (www.chairs.gc.ca). This work was supported by Action Concertée FQRNT - Fonds de la recherche forestière du Saguenay - Lac-Saint-Jean.

References

- Andreadis, A.A., Hazen, S.L., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med.* 35, 213-225.
- Anderson, D., Liu, J.J., Nilsson, A., Duan, R.D., 2003. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Research* 23, 3317-3322.
- Basnet, P., Kadota, S., Terashima, S., Shimizu, M., Namba, T., 1993. Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 41, 1238-1243.
- Bauerova, K., Bezek, A., 1999. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys.* 18, 15-20.
- Burgesse, J.A., 1944. The Woman and the Child Among the Lac-St.-Jean Montagnais. *Primitive Man* 17, 1-18.
- Chandler, R.F., Freeman, L., Hooper, S.H., 1979. Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 1, 49-68.
- Chandramu, C., Manohar, R.D., Krupadanam, D.G.L., Dashavantha, R.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy research* 17, 129-134.
- Collins, M.A., Charles, H.P., 1987. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis*. *Food Microbiology* 4, 311-315.

Costa, V.B., Coube, C.S., Marinho, B.G., Matheus, M.E., Leitao, S.G., Fernandes, P.D., 2003. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. *Fitoterapia* 74, 364-371.

Fan, Y.M., Xu, L.Z., Gao, J., Wang, Y., Tang, X.H., Zhao, X.N., Zhang, Z.X., 2004. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia* 75, 253-260.

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

Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B. Jr., Nacy, C.A., 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* 144, 278-283.

Gunther, E., 1973. *Ethnobotany of Western Washington*. Revised edition, University of Washington Press, Seattle, USA.

Gupta, M.B., Nath, R., Gupta, G.P., Bhargava, K.P., 1981. Antiulcer activity of some plant triterpenoids. *Indian Journal of Medical Research* 73, 649-652.

Horton, J.W., 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189, 75-88.

Hsu, H.-Y., Yang, J.J., Lin, C.-C., 1997. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Letters* 111, 7-13.

Jiang, F., Dusting, G.J., 2003. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr Vasc Pharmacol.* 1, 135-56.

Jin, C., Strembiski, W., Kulchytska, Y., Micetich, R.G., Daneshtalab, M., 1999. Flavonoid glycosides from *Ledum palustre* subsp. *decumbens*. *Daru* 7, 5-8.

Jobidon, R., 1995. Autoécologie de quelques espèces de compétition d'importance pour la régénération forestière au Québec. Mémoire de recherche forestière 117, Gouvernement du Québec.

Kim, S.H., Ahn, B.-Z., Ryu, S.Y., 1998. Antitumor effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffus*. *Phytotherapy Research* 12, 553-556.

Kriwacki, R.W., Pitner, T. P., 1989. Current aspects of practical two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: applications to structure elucidation. *Pharmaceutical Research* 7, 531-554.

Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont J.C., 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica* 69(5), 402-407.

Leighton, A. L., 1985. Wild Plant Use by the Woods Cree (Nihithawak) of East-Central Saskatchewan. National Museums of Canada, Mercury Series, Ottawa, Canada.

Li, J., Guo, W.J., Yang, Q.Y., 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology* 8, 493-495.

Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 49: 57-68.

Middleton, E. Jr., 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medecine and Biology* 439, 175-182.

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

Mshvildadze, V., Elias, R., Faure, R., Rondeau, D., Debrauwer, L., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E., Balansard, G. Triterpenoid, 2004. Saponins from Leaves of *Hedera pastuchowii* *Chem.Pharm.Bull.* 52 : 1411-1415.

Muto, Y., Ninomiya, M., Fujiki, H., 1990. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 20, 219-224.

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.

Owen, P.L., Johns, T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 149-160.

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.

Rahman, I., 2002. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 291-315.

Rousseau, J., 1947. Ethnobotanique Abenakise. *Archives de Folklore* 11, 145-182.

Ryu, S.Y., Oak, M.H., Yoon, S.K., Cho, D.I., Yoo, G.S., Kim, T.S., Kim, K.M. 2000 Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Medica* 66, 358-360.

Shukla, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., Tripathi, R.C., Srimal, R., Dayal, Dobhal, D.C., 1992. Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucalyptus* hybrid. *Phytotherapy research* 6, 74-79.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

Szabo, C., 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* 140-141, 105-112.

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, Victoria, Canada.

Table 1

Extraction yields, antioxidant activities and phenolic contents of leaf and twig methanol extracts from *L. groenlandicum*.

Samples	Yields	ORAC value	Total phenolic compounds
	(g/g) ^a	(μ Mol Trolox/mg) ^b	(g/g) ^c
Leaves extract	0.12	16 \pm 2	0.20 \pm 0.01
Twigs extract	0.12	20 \pm 2	0.39 \pm 0.02
Gallic acid	(-)	13 \pm 3	(-)
Quercetin	(-)	31 \pm 3	(-)

^a g solid methanol extract/g dried biomass

^b ORAC : Oxygen Radical Antioxidant Capacity

^c g total phenolic compounds/g extract: Tannic acid equivalents (mean \pm S.D.; n=3)

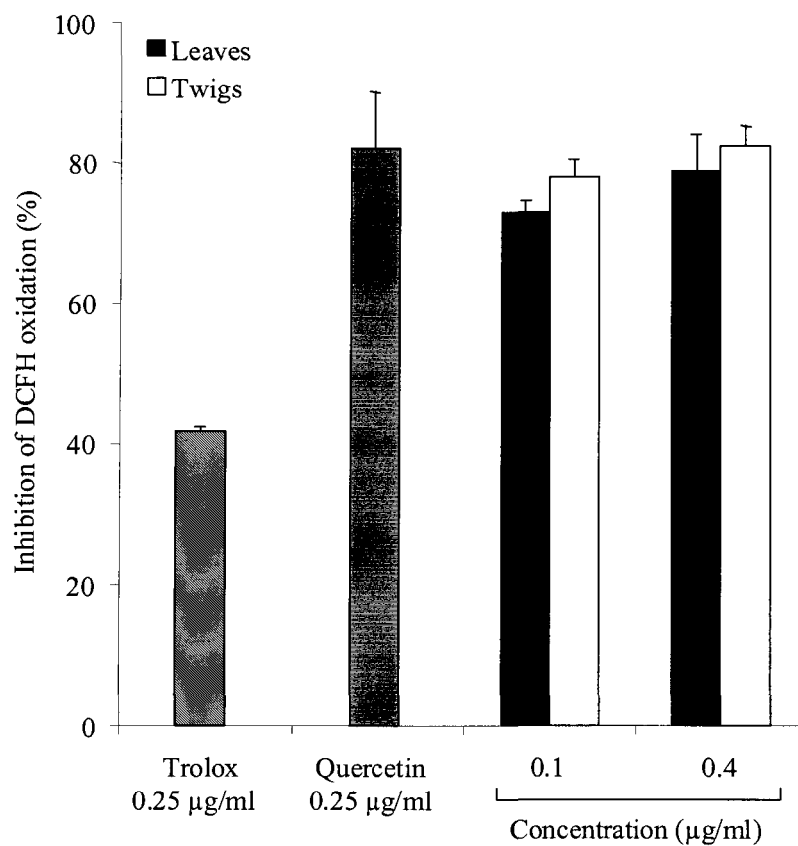


Fig.1. Antioxidant effect of leaf and twigs methanol extracts from *L. groenlandicum* on L-929 cell lines treated with tert-butyl hydroperoxide. Trolox (0.25 µg/ml) and quercetin (0.25 µg/ml) were used as standards. Each value represents the mean \pm S.D. of three determinations.

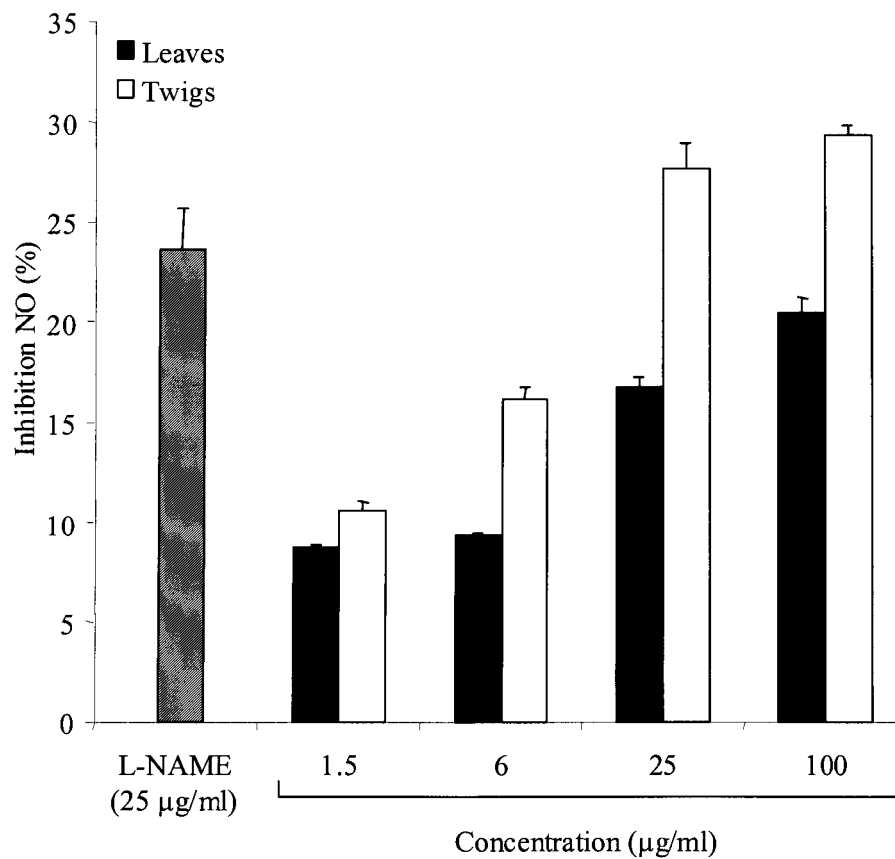


Fig.2. Effect of leaf and twig methanol extracts from *L. groenlandicum* on NO overproduction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Each value represents the mean \pm S.D. of three determinations.

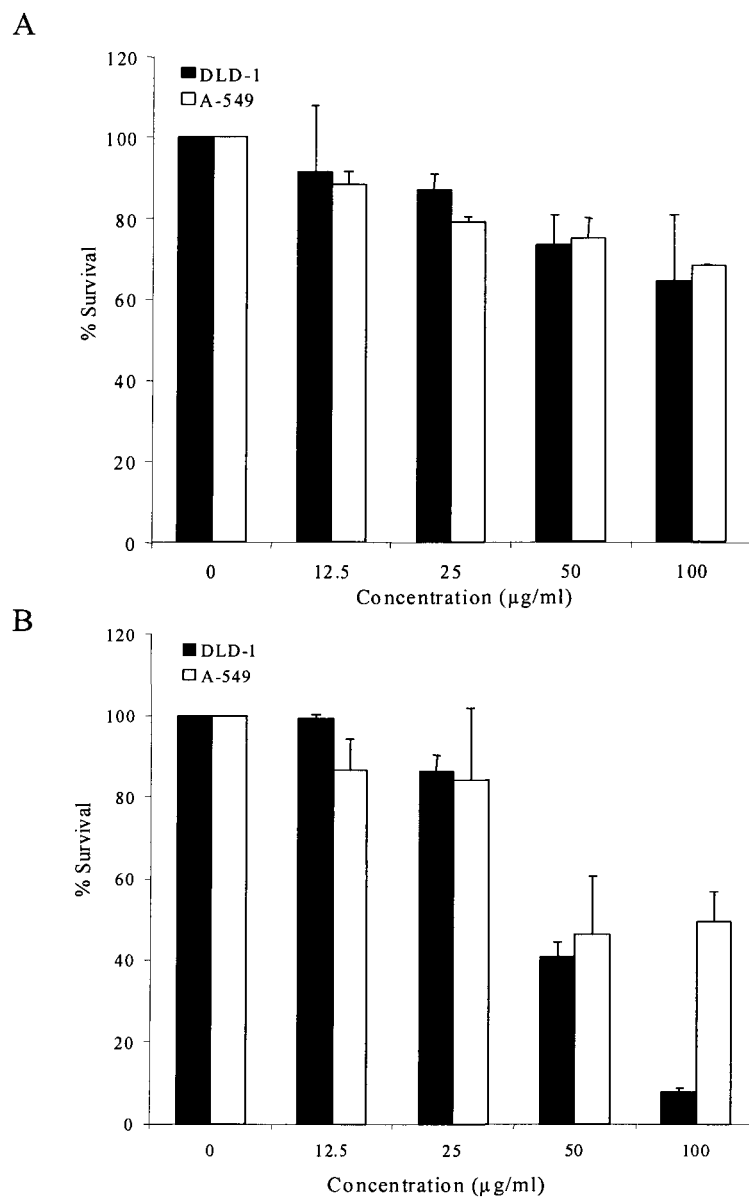


Fig.3. Cytotoxic effect of leaf (A) and twig (B) methanol extracts isolated from *L. groenlandicum* against carcinoma colon cell lines DLD-1 and lung adenocarcinoma cell lines (A-549). 5-FU was used as a positive control and exhibited a IC_{50} of $18 \pm 3 \mu M$ for DLD-1 and $4 \pm 1 \mu M$ for A-549. Each value represents the mean \pm S.D. of three determinations.

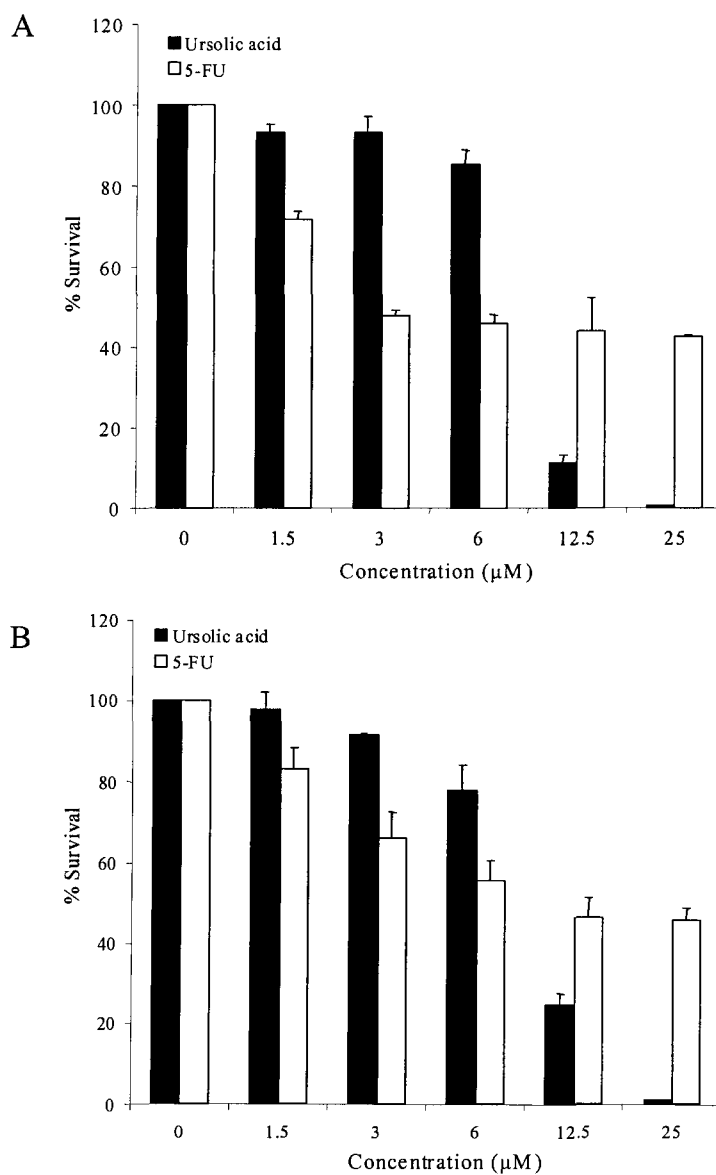


Fig.4. Cytotoxic effect of ursolic acid against carcinoma lung cell line, A-549 (A) and carcinoma colon cell line, DLD-1 (B). 5-FU was used as a positive control and exhibited a IC_{50} of $18 \pm 3 \mu\text{M}$ for DLD-1 and $4 \pm 1 \mu\text{M}$ for A-549. Each value represents the mean \pm S.D. of three determinations.

CHAPITRE 3

ÉTAT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX

Ce travail de recherche a permis de démontrer que le *L. groenlandicum* possédait des activités antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse. L'acide ursolique, un composé majoritaire de la plante, a été isolé et pourrait être en partie responsable de l'activité anticancéreuse. Les résultats de cette étude ont été présentés dans un article qui sera publiés dans Journal of Ethnopharmacology. L'objectif de cette section vise d'abord à détailler la caractérisation et l'isolation de l'acide ursolique guidée par l'activité anticancéreuse. De plus, cette partie a pour but de rapporter les résultats concernant les activités antioxydantes des extraits de *L. groenlandicum* et de l'acide ursolique. Les activités anti-inflammatoire, antifongique et antibiotique des extraits de *L. groenlandicum* y sont également présentées. Finalement, cette section décrit les diverses activités biologiques de l'acide ursolique rapportées dans la littérature en lien avec nos travaux.

Activité anticancéreuse des extraits de *L. groenlandicum* et identification du composé responsable de l'activité, l'acide ursolique

L'activité anticancéreuse d'extrait de *L. groenlandicum* n'avait jamais été démontrée dans la littérature. Par contre, deux dérivés glycosidiques de la quercétine isolés des feuilles du *Ledum palustre* se sont montrés cytotoxiques contre le carcinome de l'épiderme de la bouche humaine (Jin *et al.* 1999) L'activité anticancéreuse des extraits méthanoliques de feuilles et de branches de cette espèce a donc été testée sur une lignée cellulaire de carcinome du colon, DLD-1, ainsi que sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome du poumon, A-549. L'extrait méthanolique de feuilles s'est avéré inactif avec une IC₅₀ de plus de 100 µg/ml sur les deux lignées. Par contre, l'extrait méthanolique de branche a démontré

une activité anticancéreuse intéressante avec une IC_{50} de 43 ± 1 $\mu\text{g/ml}$ sur les carcinomes du colon (DLD-1) et de 65 ± 8 $\mu\text{g/ml}$ sur l'adénocarcinome du poumon (A-549). Une isolation guidée par l'activité anticancéreuse a permis d'isoler un triterpène bien connu, l'acide ursolique (Figure 4). Cette molécule était active contre les DLD-1 (IC_{50} : $9,3 \pm 0,3$ μM) et contre les A-549 (IC_{50} : $8,9 \pm 0,2$ μM) suggérant qu'elle pourrait être responsable de l'activité anticancéreuse de l'extrait de branches de *L. groenlandicum* (Dufour *et al.*, 2006). La figure 5 présente le schéma détaillé menant à l'isolation de cette molécule. L'identification de l'acide ursolique a été effectuée à l'aide de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse. Ces données spectroscopiques ont également été comparées avec celles de la littérature afin de confirmer l'identification de l'acide ursolique. Les spectres RMN et les spectres de masse se retrouvent en annexe. Il est important de mentionner que le produit isolé doit être méthylé avant de procéder à l'analyse par GC-MS. Le spectre de masse obtenu a permis d'identifier le produit isolé comme étant l'acide ursolique (selon la banque commerciale de spectre de masse NBS 75K). En RMN, le spectre ^{13}C permettait de détecter 30 carbones dont un carbonyle (180 ppm) et deux carbones d'une fonction alcène (125,3 ppm et 139,1 ppm). Le DEPT 135 a ensuite permis d'affirmer que la double liaison était trisubstituée puisque un des carbones n'était pas apparent (carbone quaternaire) et que l'autre avait un signal positif (CH et CH_3 seulement). Le spectre proton une dimension révélait quant à lui la présence de deux méthyles sur des carbones adjacents puisque leur signal était sous forme de doublet. Les autres signaux ont ensuite été assignés avec l'aide des spectres deux dimensions COSY, TOCSY, HSQC et HMBC. L'identification de l'acide ursolique est de plus appuyée par l'analyse GC-MS d'un

standard (acide ursolique, Sigma Aldrich) et en comparant les données RMN avec celle de la littérature (Doddrell *et al.* 1974; Kriwacki *et al.* 1989; Seo *et al.* 1975).

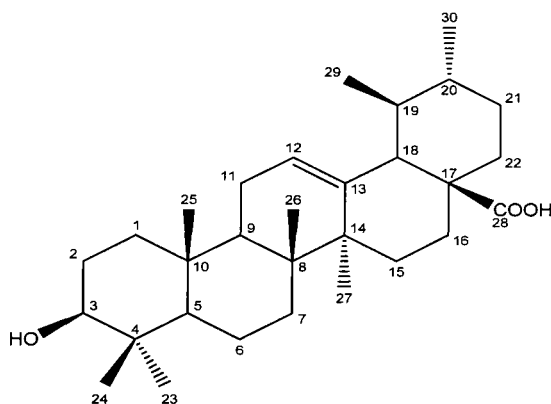


Figure 4 : Acide ursolique

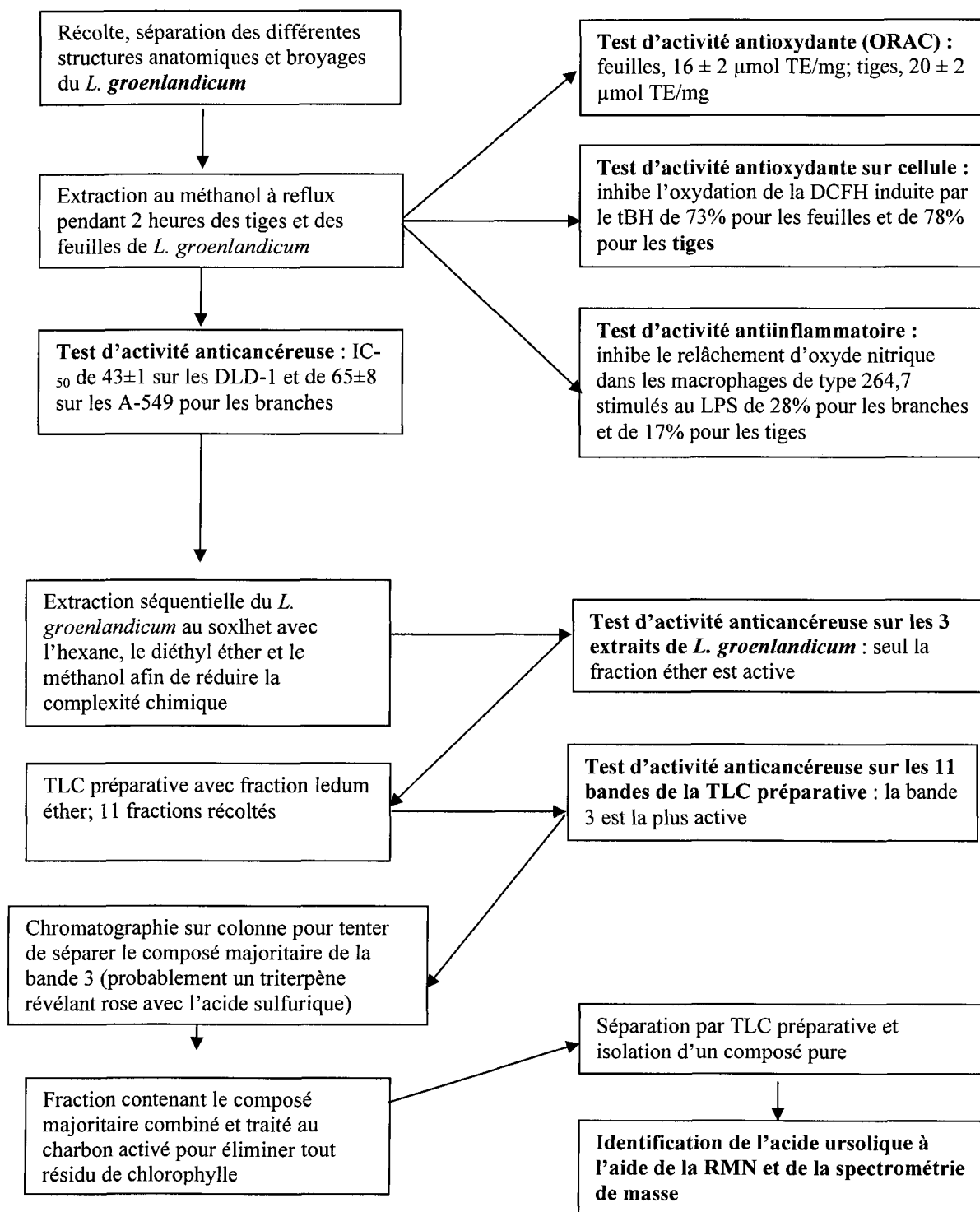


Figure 5 : Schéma expérimental menant à l'isolation de l'acide ursolique

Activité antioxydante des extraits de *L. groenlandicum* et de l'acide ursolique

L'équipe de recherche de Owen a démontré qu'un extrait de feuilles de *L. groenlandicum* possédaient une activité antioxydante indirect par l'inhibition de la xanthine oxydase (Owen and Johns 1999). Par contre, l'activité antioxydante d'extrait de *L. groenlandicum* n'a jamais été démontrée directement. Les résultats présentés dans l'article (Dufour *et al.*, 2006) montre l'efficacité des extraits de feuilles et de tiges de *L. groenlandicum* en tant qu'antioxydant. L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de deux tests, soit un test chimique (ORAC) et un test cellulaire. Les deux approches consistent à évaluer la capacité d'un extrait ou d'un composé à inhiber l'oxydation d'une sonde *in vitro* (ORAC) ou dans un contexte cellulaire (Ou *et al.* 2002; Legault *et al.* 2003). Les deux extraits de *L. groenlandicum* ce sont montrés actifs *in vitro* en utilisant le test ORAC. Leur activité était de 16 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour les feuilles et de 20 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour les tiges. Cette activité est intéressante si on compare avec deux composés phénoliques utilisés comme standard avec des valeurs ORAC de 13 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour l'acide gallique et de 31 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour la quercétine. L'activité a également été vérifiée par un test cellulaire dans lequel 0,1 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de feuilles et de tiges inhibaient l'oxydation de la DCFH induite par le tBH de 73% et 78% respectivement. En comparaison, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de trolox et de quercétine inhibaient l'oxydation de la DCFH de 42% et 82% respectivement. Ces résultats supportent l'utilisation ethnopharmacologique du *L. groenlandicum* contre des pathologies impliquant les ROS.

L'activité antioxydante de l'acide ursolique a ensuite été testée pour vérifier si celle-ci pourrait expliquer, en partie, l'activité antioxydante des extraits de *L. groenlandicum*.

L'activité sur cellule était intéressante avec une concentration minimale effective de 3 $\mu\text{g/ml}$. En comparaison, la vitamine E, un autre antioxydant connu, n'est pas aussi actif (concentration minimale effective de 6,89 $\mu\text{g/ml}$). Par contre, pour l'activité ORAC, l'acide ursolique ne possédait pas d'activité significative (0,0086 μM Trolox / mg d'acide ursolique). L'activité sur cellule laisse croire que l'acide ursolique peut jouer un rôle dans l'activité observée pour l'extrait méthanolique de branches. Il est important de mentionner que le test ORAC n'est pas très efficace pour tester des molécules hydrophobes comme l'acide ursolique et qu'il ne tient pas compte du contexte cellulaire. De plus, dans le test sur cellule, l'oxydation est effectuée par le tBH alors que pour le test ORAC, ce sont les radicaux peroxy qui jouent ce rôle. Les résultats des deux tests ne sont donc pas vraiment comparables.

Activité anti-inflammatoire des extraits de *L. groenlandicum*

Il est connu dans la littérature que les ROS et les RNS sont impliqués dans plusieurs maladies impliquant un processus inflammatoire (Beaurova and KBezsek, 1999; Rahman, 2002; Horton, 2003). L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages murins 264,7 stimulés au LPS (Green *et al.* 1990). L'inhibition était de 28% pour les branches et de 17% pour les feuilles ce qui est comparable à la valeur (24%) du N-omega-nitro-L-arginine, un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthétase (Dufour *et al.*, 2006). Cette activité pourrait être due à la présence de composés phénoliques qui ont été détectés dans le *L. groenlandicum* (Dufour *et*

al. 2006). Ces résultats supportent l'utilisation ethnopharmacologique du *L. groenlandicum* dans le traitement de l'inflammation impliquant le NO et le peroxy-nitrite.

Activité antifongique et antibiotique des extraits de *L. groenlandicum*

L'activité antifongique et antibactérienne des extraits bruts de *L. groenlandicum* ont également été évaluées. Les levures (*C. albicans*) et bactéries (*E.coli*, *S aureus*) ont été incubées pendant huit heures à 37°C en présence ou en absence d'extraits. Le nombre de levures et de bactéries a été quantifié à l'aide de la resazurin (To *et al.* 1995) et le pourcentage de survie a été calculé pour chacune des concentrations testées. Les résultats obtenus montrent que les extraits de branches et de feuilles de *L. groenlandicum* n'inhibe pas la croissance d'*E. coli*, de *S. aureus* et de *C. albicans*.

REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE URSOLIQUE

L'acide ursolique dans le règne végétal

L'acide ursolique est un triterpène pentacyclique de la famille des cyclosqualénoïdes (Cardenas *et al.* 2004). Il fut identifié pour la première fois par Trommsdorff en 1893 à partir des feuilles de l'*Arcotostaphylos uva ursi* L. (Es-Saady *et al.* 1994). Plusieurs dérivés de l'acide ursolique ont été identifiés dans le règne végétal (Novotny *et al.* 2001). L'acide ursolique est un métabolite secondaire (Novotny *et al.* 2001); les terpènes constituent d'ailleurs un des groupes principaux de métabolites secondaires. Dans la plante, il semble jouer un rôle défensif contre les herbivores et différentes formes de pathogènes. On le

retrouve naturellement dans une quantité impressionnante de plante d'origine très variée incluant *Calluna vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Sambucus chinesis* et *Tripterospermum taiwanense* pour ne nommer que celles-là. Il est également courant dans les cires recouvrant la pelure des pommes, des poires et d'autres fruits.

Plusieurs plantes contenant l'acide ursolique étaient utilisées dans la médecine traditionnelle en tant qu'anti-inflammatoire, analgésique, cardiotonique, hépatoprotecteur, etc. (Liu 1995). La science moderne a permis d'identifier l'acide ursolique comme étant le principe actif dans plusieurs de ces cas. En quelques années seulement, plusieurs équipes de recherche ont démontré que l'acide ursolique possédait un effet antitumoral, antibactérien, anti-inflammatoire, anti-HIV, répulsif, anti-hyperlipidémique, antipyrétique, antidiabétique, antiathérosclérose, antiulcéreux et hépatoprotecteur.

Activité anticancéreuse de l'acide ursolique

L'activité anticancéreuse de l'acide ursolique et son mécanisme d'action ont fait l'objet de plusieurs publications. L'acide ursolique a d'ailleurs déjà été recommandé dans la lutte contre le cancer de la peau au Japon (Muto *et al.* 1990). Plusieurs de ces publications seront résumées ici.

Kim *et al.* ont travaillé sur *Oldenlandia diffusa*, une plante de la famille des rubiacées retrouvée dans le nord-est de l'Asie et couramment utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour ces propriétés contre les rhumatismes, l'arthrite et l'appendicite. Un extrait

méthanolique de la plante en question, actif sur plusieurs lignées cancéreuses, a ouvert la voie à d'autres expérimentations. Une isolation guidée par l'activité a permis l'isolation de l'acide ursolique en tant que composé actif (0,15% de rendement). Comme l'extrait méthanolique, l'acide ursolique démontrait une activité *in vivo* et *in vitro*. Sur cellule, l'IC₅₀ de l'acide ursolique se situait entre 3,6 et 4,9 µg/ml tandis que la durée de vie de souris portant un sarcome-180 était doublée. L'acide ursolique serait actif via un processus apoptotique (Kim *et al.* 1998).

En 1997, l'équipe de Baek a également travaillé sur l'apoptose provoquée par l'acide ursolique sur les cellules cancéreuses. Ils se sont penchés sur la concentration intracellulaire de Ca²⁺ alors qu'une augmentation de celle-ci est considérée comme un médiateur de l'apoptose. Il semble que des cellules HL-60 traitées avec l'acide ursolique à 10 µM présentent une augmentation initiale importante de la concentration de calcium intracellulaire suivie d'une augmentation constante sur une période de 100 secondes. Ces cellules présentaient un pourcentage de viabilité significativement plus bas que celles non traitées à l'acide ursolique. Les chercheurs ont également vérifié l'effet de quatre inhibiteurs du relâchement du calcium sur la viabilité des cellules traitées à l'acide ursolique. La viabilité des cellules augmente de beaucoup après l'application d'inhibiteurs du relâchement du calcium. Ces résultats suggèrent que le calcium est lié à l'apoptose induit par l'acide ursolique. Dans le noyau, le calcium activerait une endonucléase qui a la propriété de cliver l'ADN double brin au niveau des nucléosomes ce qui induit l'apoptose (Baek *et al.* 1997).

En 2000, Kim *et al.* ont rapporté que l'inhibition de la réplication de l'ADN pourrait expliquer l'activité pro-apoptotique de l'acide ursolique. Les expériences effectués par Kim et al (2000) ont permis de démontrer que l'acide ursolique induisait le relâchement du cytochrome c dans le cytosol et l'activation de la caspase-3. En présence d'ATP, le cytochrome c forme des complexes avec la caspase-3 et d'autre type de caspase qui clive le substrat (poly(ADP-ribose) polymerase, ADN, etc.) et provoque ultimement l'apoptose. L'acide ursolique a également montré la capacité de bloquer le cycle cellulaire en G₀/G₁. L'inhibition du cycle cellulaire serait provoqué par une augmentation de l'expression de la protéine inhibitrice de Cdk, la protéine p21 (Kim *et al.* 2000).

Une vaste étude menée par Hsu *et al.* en 2004 a donné d'autres indices sur le mécanisme d'action de l'acide ursolique menant à l'apoptose. En plus de reprendre des éléments déjà mentionnés plus haut, ils ont démontré la participation du système de Fas/FasL dans l'apoptose causée par l'acide ursolique. La liaison des ligands Fas sur le système Fas/APO-1 induit la trimérisation de ce récepteur ce qui active la cascade des caspases impliquées dans l'apoptose. Les résultats montrent que le niveau des deux types de ligands connus (ceux lié à la membrane et les ligands solubles) baissait après traitement à l'acide ursolique dans les cellules de cancer du poumon. Le traitement à l'acide ursolique a également eu comme effet la diminution de l'expression des facteurs antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W) accompagnée d'une augmentation des facteurs proapoptotiques (Bax, Bad, Bak, Bok/MTD, Bcl-Xs, NOXA) (Hsu *et al.* 2004).

L'équipe de recherche de Hsu a travaillé sur l'activité anticancéreuse de l'acide ursolique et de l'acide oléanolique isolés de deux plantes chinoises soit *Hedyotis corymbosa* (L.) et *Hedyotis diffusa* Willd.. Ils se sont penchés plus spécifiquement sur l'inhibition de la croissance des tumeurs (sarcome-180) et sur la dégradation du système hématopoïétique induit par les radiations. L'acide ursolique a démontré un effet inhibiteur marqué sur les tumeurs implantées sous la peau des souris, au niveau du fémur. Il a également provoqué un retour à la normale du nombre de leucocytes après irradiation du corps par des rayons gamma. Cette augmentation serait due à une régénération de cellules précurseurs de la moelle osseuse. Cette régénération serait quant à elle due au relâchement de facteur de stimulation de colonies de type granulocyte/macrophage qui induit la prolifération ou la différenciation des cellules pro-génitrices hématopoïétiques (Hsu *et al.* 1997).

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, du cholestérol et des stéroïdes. Ils jouent également un rôle dans le métabolisme de plusieurs xénobiotiques comme les drogues, les carcinogènes et les polluants environnementaux. En fait, ces enzymes activent des procarcinogènes, elles sont donc une cible de choix pour la prévention du cancer. Kim *et al.* ont d'ailleurs travaillé sur l'inhibition de ces enzymes par l'acide ursolique et l'acide oléanolique. Les résultats montrent que l'acide ursolique inhibe les réactions catalysées par CYP2C19, mais n'a aucun effet sur les autres CYP. Ceci suggère donc que l'acide ursolique interfère avec les

drogues métabolisées par CYP2C19. Par contre, la littérature ne montre aucun lien entre la formation de cancer et ce cytochrome (Kim *et al.* 2004). L'inhibition des CYP joue également un rôle dans l'inhibition des dommages causés au foie (Zhang and Liu 1984).

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou angiogénèse est un processus étroitement contrôlé au cours du développement embryonnaire. L'angiogénèse est nécessaire à la progression et à la dispersion des cellules cancéreuses (métastase). Les composés anti-angiogènes qui inhibent ce processus sont donc intéressants dans la lutte contre le cancer. Cardenas *et al.* ont étudié l'effet de l'acide ursolique sur le développement des vaisseaux sanguins. Ils ont d'abord testé l'inhibition de la formation de vaisseaux dans des œufs. Les résultats montrent que l'acide ursolique, à une concentration de 50 μM , inhibe l'angiogénèse dans 100 % des cas. Ils se sont ensuite penchés sur l'inhibition des cellules endothéliales du système sanguin. L'acide ursolique inhibe la formation des cellules avec un IC_{50} de 13 μM ce qui est comparable aux résultats obtenus pour d'autres agents anti-angiogéniques connus comme le resveratrol, la quercetine et l'humulone (Cardenas *et al.* 2004). Les résultats de Cha et de ses collaborateurs montrent que l'acide ursolique possède également une activité anti-invasive sur les fibrosarcomes humains de type HT-1080. L'acide ursolique inhibe également la formation des capillaires en empêchant la différenciation des cellules endothéliales et ce à une concentration non cytotoxique de 15 μM (Cha *et al.* 1996).

Activité antioxydante de l'acide ursolique

On retrouve quelques éléments concernant l'activité antioxydante de l'acide ursolique dans la littérature. Andrikopoulos *et al.* ont récemment testé l'efficacité de résines provenant de plantes grecques ainsi que quelques composés purs isolés de celles-ci sur l'oxydation des LDL *in vitro*. Chez l'humain, les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont les principaux transporteurs du cholestérol vers les tissus et elles sont impliquées dans la déposition du cholestérol dans les tissus endothéliaux ce qui provoque, à long terme, des maladies cardio- vasculaires (Goldstein and Brown, 1997). Une modification des LDL due à l'oxydation semble favoriser le phénomène d'athérosclérose et entraîne une augmentation du risque de maladie cardio-vasculaire. L'acide ursolique s'est révélé comme un des composés les plus efficaces vu qu'il présente un pourcentage de protection contre l'oxydation de 69,4 % à une concentration de 20 μ M. Par contre, aucun des composés testés lors de cette série de test n'est arrivé à égaler l'activité de la résine de *Pistacia lentiscus* var. *Chia* qui était de 75,3 % (Andrikopoulos *et al.* 2003).

L'équipe de Hung a récemment travaillé sur l'activité antioxydante d'extrait d'une plante chinoise : *Mesaona procumbens* Hemsl. L'activité antioxydante de cette plante ayant déjà été démontrée, l'objectif était de tenter d'identifier le ou les composés responsables de l'effet antioxydant. Après une isolation guidée par l'activité, ils ont isolé l'acide ursolique en plus de trois autres composés dans la fraction acétate d'éthyle. De ces quatre composés, l'acide ursolique a présenté le meilleur potentiel d'inhibition (38 %) mais ce résultat s'éloigne beaucoup de celui obtenu pour l'extrait brut de 93 % d'inhibition (Hung *et al*

2002). Cette grande différence peut être attribuée à la présence de composés mineurs très actifs dans l'extrait brut ou encore à une synergie entre les différents composés présents dans l'extrait.

On sait depuis longtemps que la présence de radicaux libres peut entraîner des dommages cellulaires potentiellement à la source de la formation de divers types de cancers (Swartz 1978). La présence de produit ayant la capacité de neutraliser ces radicaux libres peut réduire ces dommages cellulaires. Balanerhu et Nagarajan ont testé la capacité de protection de l'acide ursolique et de l'acide oléanolique sur la peroxydation lipidique induite expérimentalement. Les résultats montrent que l'acide ursolique réduit de 60% la peroxydation lorsque qu'il est administré avant l'exposition à l'agent induisant la peroxydation. Ceci est possiblement explicable par le fait que l'acide ursolique possède la capacité de capter les molécules de fer maintenant ainsi le système ADP-fer dans un état réduit ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans notre cas, l'acide ursolique est active sur cellule (chelateur d'ions ferriques) et non sur ORAC. Lorsque l'acide ursolique est additionné au système après le pro-oxydant, une certaine inhibition est observée, mais rien de comparable avec la pré addition. Dans ce cas, l'acide ursolique préviendrait des dommages supplémentaires en captant de nouveaux radicaux libres sans toutefois inverser les dommages déjà causés (Balanerhu and Nagarajan 1991).

Activité anti-inflammatoire de l'acide ursolique

L'activité anti-inflammatoire observée pour les extraits bruts pourrait également être expliquée en partie par l'acide ursolique en se basant sur la littérature. En effet, Fan *et al.* ont étudié l'effet de l'acide ursolique isolé de *Terminalia catappa* en tant qu'anti-inflammatoire. Cette plante avait déjà démontré une activité anti-inflammatoire et elle était utilisée pour le traitement de la dermatite et de l'hépatite dans la médecine traditionnelle. L'activité anti-inflammatoire a été mesurée en mesurant l'inhibition de l'œdème induit par le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) sur une oreille de souris. Le pourcentage d'inhibition obtenu correspond à la différence de masse entre l'œdème traité à l'acide ursolique par rapport au témoin traité à l'acétone. Les résultats montrent une grande efficacité de l'acide ursolique (0,3 mg/oreille) qui inhibe 50% de l'inflammation ce qui se rapproche beaucoup du standard d'indométacine (0,3 mg/oreille) qui provoque 57% d'inhibition. L'application de TPA active la protéine kinase 3 amenant l'érythème, l'œdème et l'infiltration de leucocyte. Cette infiltration produit une augmentation de l'activité de la myeloperoxydase dans le tissu touché; une inhibition de son activité est donc un signe d'une activité anti-inflammatoire ce qui a été démontré ici pour l'acide ursolique. L'acide ursolique est donc en partie responsable de l'activité anti-inflammatoire de *T. catappa* (Fan *et al.* 2004).

Costa *et al.* ont également travaillé sur l'activité anti-inflammatoire de l'acide ursolique. La plante d'origine pour leurs travaux était la *Bouchea fluminensis* originaire du Brésil. L'œdème était cette fois produit par la carragénine, l'histamine ou la sérotonine. Un

mélange d'acide ursolique, d'acide oléanolique et d'acide micromérique a efficacement inhibé l'œdème induit par la carragénine et par la sérotonine ce qui concorde avec les résultats précédemment énoncés. Par contre, Costa cite des mécanismes d'action différents de ceux de Fan (Fan *et al.* 2004) pour expliquer l'activité. L'inhibition de la lipoxigénase et de la cyclo-oxygénase ou de l'élastase pourrait être à l'origine de l'activité. D'un autre côté, les effets inhibiteurs de plusieurs triterpènes pentacycliques dont l'acide ursolique dans ce type de test peuvent être annulés par la progestérone, l'actinomycine D et la cyclohesimide. Ceci suggère donc qu'ils induisent un effet via l'activation des récepteurs des glucocorticoïdes, ainsi que par la synthèse de l'ARNm et des protéines (Costa *et al.* 2003).

Trevoa trinervis est utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle chilienne pour traiter l'inflammation due aux brûlures et aux coupures (Delporte *et al.* 1997). Un fractionnement guidé par l'activité anti-inflammatoire a permis d'isoler les acides bétulinique, ursolique et oléanolique comme étant les principaux composés actifs de la fraction dichlorométhane de cette plante.

Activité antifongique de l'acide ursolique

Pour ce qui est de l'activité antifongique de l'acide ursolique, le seul élément retrouvé dans la littérature expose l'activité de dérivés glycosidiques de l'acide ursolique. Deux composés, soit le β -gentobioside et le β -maltotrioside flanqué du méthyle ursolate sont les seuls composés présentant une activité avec des IC_{50} respectifs de 5,9 et 9,4 μ M contre

Trichophyton mentagrophytes. L'acide ursolique n'était pas actif avec une IC_{50} de plus de 220 μ M (Takechi and Tanaka 1993). Nos résultats pour l'inhibition de *Candida albicans* concordent avec ceux de ces auteurs, l'acide ursolique présentant une IC_{50} de plus de 200 μ M.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

L'objectif scientifique de ce projet était d'étudier l'activité biologique du *L. groenlandicum*. Cette plante était couramment utilisée dans la médecine traditionnelle amérindienne pour traiter diverses pathologies comme l'asthme, l'arthrite, les brûlures et les rhumatismes. Ces maladies impliquent tous un processus inflammatoire et l'oxydation des biomolécules comme les protéines et les lipides. Les activités antioxydante et anti-inflammatoire du *L. groenlandicum* ont donc été testées en plus des activités anticancéreuse, antibiotique et antifongique.

Les extraits des tiges et des feuilles de cette espèce montraient une activité antioxydante autant par un test chimique (ORAC) que cellulaire. L'activité anti-inflammatoire des deux extraits était significative avec des valeurs comparables au témoin. Ces résultats supportent son utilisation ethnopharmacologique. Finalement, l'extrait méthanolique des tiges de cette espèce montrait une activité anticancéreuse intéressante sur les carcinomes du colon et du poumon. Par contre, les extraits se sont montrés inactifs pour le potentiel antibiotique et antifongique.

Une isolation guidée par l'activité anticancéreuse entre chaque étape a permis d'isoler l'acide ursolique en tant que principe actif. La chromatographie sur colonne sur gel de silice et la chromatographie sur couche mince préparative ont été les deux méthodes principalement utilisées pour l'isolation. L'acide ursolique, isolée pour la première fois à dans le *L. groenlandicum*, est bien connue dans la littérature puisqu'on lui attribue des activités anticancéreuse, anti-inflammatoire, anti-HIV, anti-ulcéreuse, etc. Cette molécule

pourrait expliquer, du moins en partie, l'activité anticancéreuse observée. De plus, l'activité anti-inflammatoire de l'acide ursolique a été démontrée par plusieurs groupes de recherche. La présence de l'acide ursolique dans le *L. groenlandicum* pourrait donc en partie expliquer son efficacité pour traiter l'inflammation.

CHAPITRE 5

PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette étude, nous avons démontré l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse du *L. groenlandicum*. L'acide ursolique isolé de cette plante pourrait expliquer, en partie, l'activité anti-inflammatoire et anticancéreuse de la plante. Cependant, l'acide ursolique ne semble pas responsable de l'activité antioxydante (ORAC). Il serait donc intéressant d'identifier les principaux composés responsables de cette activité en effectuant une isolation guidée par celle-ci.

Le *L. groenlandicum* ayant fait l'objet de très peu d'étude scientifique, la composition chimique de cette plante reste à détailler. Ceci permettrait peut-être de découvrir des composés inconnus possédant un intérêt pharmacologique. Une recherche comme celle-ci se devrait de débiter par la caractérisation des grandes familles chimiques retrouvées dans la plante par des tests colorimétriques et des TLC. D'autres parties de la plante (racine, fleur, bourgeon) pourraient également être étudiées. Ce genre d'étude corrélée avec une étude des composés chimiques du sol associés au lédon pourrait peut-être aider à répondre à quelques questions sur l'allélopathie puisque cette plante a été étudiée dans le cadre de cette problématique.

Il serait également intéressant de vérifier la variation de l'activité et du contenu en acide ursolique du *L. groenlandicum* en fonction de la saison, de la date et du lieu de récolte. Les travaux de maîtrise de Belleau (Belleau 1990) mentionnent d'ailleurs que la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante tend à varier au cours de la saison estivale. D'autres méthodes d'isolation pourraient également être testées dans le but d'augmenter le

rendement d'isolation de l'acide ursolique. Il serait par exemple intéressant de travailler directement sur l'extrait brut en le fractionnant par extraction liquide/liquide. Une macération sans chauffage serait également à faire pour vérifier l'effet du chauffage sur le contenu de l'extrait. De plus, certaines méthodes de synthèse pourraient être appliquées à l'acide ursolique dans le but d'améliorer ses propriétés pharmacologiques. Par exemple, l'ajout d'un groupement polaire pour former un glycoside d'acide ursolique serait envisageable.

CHAPITRE 5
BIBLIOGRAPHIE

Publication et livre

Andrealis, A.A., S.L. Hazen, Comhair, S.A. and S.C. Erzurum. 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol 35: 213-225.

Andrikopoulos, N.K., A.C. Kaliora, Assimopoulou, A.N. and V.P. Papapeorgiou. 2003. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytotherapy Research*. Vol 17: 501-507.

Baek, J. H., Y. S. Lee, Kang, C. M., J.-A. Kim, Kwon, K. S., H. C. Son and Kim K.-W. 1997. Intracellular Ca^{2+} release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *International Journal of Cancer*. Vol 73: 725-728.

Balanerhu, S. And B. Nagarajan. 1991. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochemistry international*. Vol 24, 5: 981-990.

Bauerova, K. and A. Bezek. 1999. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *General Physiology and Biophysics*. Vol 18: 15-20.

Beardsley, G. 1941. Notes on Cree Medicines, Based on Collections Made by I. Cowie in 1892. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters*. Vol 28: 483-496.

Becker, L.B. 2004. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*. Vol 61: 461-470.

Belleau, F. 1990. Analyse de l'huile essentielle du *Ledum groenlandicum* Retzius. Mémoire de Maîtrise de l'Université du Québec à Chicoutimi. 160 p.

Belleau, F. and G. Collin. 1993. Composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*. *Phytochemistry*. Vol 33, 1: 117-121.

Belousov, M.V., N.I. Belousova, Berezovskaya, T.P., S.E. Dmitruk, Klokova, M.V., N. Komissarenko, Kul'-pina, T.G. and E.A. Serykh. 1998. New pharmacological properties of the raw material of *Ledum palustre* L. of Siberian flora and the possibilities of its complex usage. *Rastitel'nye resursy*. Vol 34: 74-82.

Belousova, N.I., V.A. Khan, Klokova, M.V. and T.P. Berezovskaya. 1986. Terpenoids of the essential oil of *Ledum hypoleucum*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. Vol 1: 104-107.

Black, M.J. 1980. Algonquin ethnobotany : an interpretation of aboriginal adaptation in South Western Quebec. Ottawa. National Museums of Canada. Mercury series number 65.

- Bol'shakova, I.V., E.L. Lozovskaya and Sapezhinskii, I.I. 1997. Antioxidant properties of some plant extracts. *Biofizika*. Vol 43, 2: 186-188.
- Cardenas, C.A., R. Quesada and Medina, M. A. 2004. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 320: 402-408.
- Cha, H.J., S.K. Bae, Lee, H.Y., O.H. Lee, Sato, H., M. Seiki, Park, B.C. and K.W. Kim. 1996. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Research*. Vol 56: 2281-2284.
- Chandler, R.F., L. Freeman and Hooper S.N. 1979. Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 1: 49-68.
- Coleman, J.W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. Vol 1: 1397-1406.
- Compton, B.D. 1993. Upper North Wakashan and Southern Tsimshian Ethnobotany: The Knowledge and Usage of Plants. Ph.D. Dissertation, University of British Columbia.
- Delporte, C.L., C.N. Backhouse, Erazo, S., R.E. Negrete, Silva, C., A. Hess, Munoz, O., M.D. Garcia-Gravalos and San Feliciano, A.. 1997. Biological activities and metabolites from *Trevoa trinervis* Miers. *Phytotherapy Research*. Vol 11: 504-507.
- Densmore, F. 1928. Uses of Plants by the Chippewa Indians. SI-BAE Annual Report #44: 273-379.
- Doddrell, D.M., P.W. Khong and Lewis, K.G. 1974. The stereochemical dependence of ^{13}C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment. *Tetrahedron Letters*. Vol 27: 2381-2384.
- Dubois, M.-A., M. Wierer and Wagner, H. 1990. Palustroside, a coumarin glucoside ester from *Ledum palustre*. *Phytochemistry*. Vol 29, 10: 3369-3371.
- Dufour, D., A. Pichette, Mshvildadze, M., M.-E. Bradette-Hébert, Lavoie, S., A. Longtin, Laprise, C. and J. Legault. *Accepté*. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Es-Saady, D., A. Najid, Simon, A., A.J. Chulia and Delage C. 1994. Effets biologiques de l'acide ursolique. *Lyon Pharmaceutique*. Vol 45: 399-404.
- Fan, Y.M., L.Z. Xu, Gao, J., Y. Wang, Tang, X.H., X.N. Zhao and Zhang, Z.X. 2004. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia*. Vol 75: 253-260.

Frère Marie-Victorin. 1995. Flore Laurentienne. Les Presses de l'Université de Montréal. Troisième édition. 1093 p.

Gill, S.J. 1983. Ethnobotany of the Makah and Ozette People, Olympic Peninsula, Washington (USA). Washington State University, Ph.D. Thesis.

Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B. Jr., Nacy, C.A., 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* 144, 278-283.

Goldstein, J.L. and M.S. Brown. 1997. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*. Vol 46: 897-930.

Gunther, E. 1973. Ethnobotany of Western Washington. Seattle. University of Washington Press. Revised edition.

Halliwell, B., R. Aeschbach, Löliger, J. and O.I. Aruoma. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and chemical toxicology*. Vol 33, 7: 601-617.

Hill, N., C. Stam, van Haselen, R.A. 1996. The efficacy of Pririkweg gel in the treatment of insect bites: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pharmacy World & Science*. Vol 18, 1: 35-41.

Holmes, E.M. 1884. Medicinal plants used by Cree Indians, Hudson's Bay Territory. *The Pharmaceutical Journal and Transactions*. Vol 15: 302-304.

Horton, J.W. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*. Vol 189: 75-88.

Hsu, H.-Y., J.-J. Yang and Lin, C.-C. 1997. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Letters*. Vol 111: 7-13.

Hsu, Y.-L., P.-L. Kuo and Lin, C.-C. 2004. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sciences*. Vol 75: 2303-2316.

Hung, C.-Y. and G.-C. Yen. 2002. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50: 2993-2997.

Idaomar, M., R. El Hamss, Bakkali, F., N. Mezzoug, Zhiri, A., D. Baudoux, Munoz-Serrano, A., V. Liemans and Alonso-Moraga, A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity

of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutation research. Vol 513: 61-68.

Inderjit and Mallik, A.U. 1997. Effects of *Ledum groenlandicum* amendments on soil characteristics and black spruce seedlings growth. Plant Ecology. Vol 133: 29-36.

Inderjit and Mallik, A.U. 1996. Growth and physiological responses of black spruce (*Picea mariana*) to sites dominated by *Ledum groenlandicum*. Journal of chemical ecology. Vol 22: 575-585.

Jin, C., Strembiski, W., Kulchytska, Y., Micetich, R.G., Daneshtalab, M. 1999. Flavonoid glycosides from *Ledum palustre* subsp. *decumbens*. Daru. Vol 7 : 5-8.

Jobidon, R. 1995. Autoécologie de quelques espèces de compétition d'importance pour la régénération forestière au Québec. Mémoire de recherche forestière 117. Gouvernement du Québec. 180 p.

Kayashima, T. and T. Katayama. 2002. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 1573: 1-3.

Kim, D.-K., J.H. Baek, Kang, C.-M., M.-A. Yoo, Sung, J.-W., D.-K. Kim, Chung, H.-Y., N.D. Kim, Choi, Y.H., S.-H. Lee and Kim, K.-W. 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. International Journal of Cancer. Vol 87: 629-636.

Kim, K.-A., J.-S. Lee, Park, H.J., J.-W. Kim, Kim, C.-J., I.-S. Shim, Kim, N.-J., S.-M. Han and Lim, S. 2004. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. Life Sciences. Vol 74: 2769-2779.

Kim, S.H., B.-Z. Ahn and Ryu, S.Y. 1998. Antitumor effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffus*. Phytotherapy Research. Vol 12: 553-556.

Krause, A. 1956. The Tlingit Indians. Seattle. University of Washington Press.

Kriwacki, R.W., Pitner, T. P., 1989. Current aspects of practical two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: applications to structure elucidation. Pharmaceutical Research 7, 531-554.

Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont J.C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. Planta Medica. Vol 69(5): 402-407.

- Leighton, A.L. 1985. Wild plant use by the Woods Cree (Nihithawak) of East-Central Saskatchewan. Ottawa. National Museums of Canada. Mercury Series.
- Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 49: 57-68.
- Mallik, A.U. 1995. Conversion of temperate forests into heaths: role of ecosystems disturbance and ericaceous plants. *Environmental Management*. Vol 19: 675-684.
- Mechling, W.H. 1959. The Malecite Indians with notes on the Micmacs. *Anthropologica*. Vol 8: 239-263.
- Mills, P.C. and A.J. Higgins. 1997. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: implications for the exercising horse. *Veterinary journal*. Vol 153: 125-148.
- Moerman, D.E. 2000. Native american ethnobotany. Ed. Timber Press Inc. Third edition. 927p.
- Muto, Y., M. Ninomiya and Fujiki, H. 1990. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Vol 20: 219-224.
- Newman, D.J., G.M. Cragg and Kenneth, M.S. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural product*. Vol 66: 1022-1037.
- Novotny, L., A. Cachalkova and Biggs, D. 2001. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma*. Vol 48, 4: 241-246.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, Flanagan, J., E. K. Deemer, Prior, R.L. and D. Huang. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50: 2772-2777.
- Owen, P.L. and T. Johns. 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 64: 149-160.
- Palmer, G. 1975. Shuswap Indian ethnobotany. *Syesis*. Vol 8: 29-51.
- Pieroni, A., V. Janiak, Durr, C.M., S. Ludeke, Trachsel, E. and M. Heinrich. 2002. *In vitro* antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic albanians in Southern Italy. *Phytotherapy Research*. Vol 16: 467-473.
- Price, K.R., J.T. Johnson and Fenwick, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 26: 27-135.

Rahman, I. 2002. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Current drug targets-Inflammation & Allergy*. Vol 1: 291-315.

Reader, R. 1978. Impact of leaf-feeding insects on three bog ericoids. *Canadian Journal of Botany*. Vol 57: 2107-2112.

Rousseau, J. 1947. Ethnobotanique Abenakise. *Archives de folklore*. Vol 11 : 145-182.

Saville, D.B.O. 1969. Interrelationships of *Ledum* species and their rust parasites in Western Canada and Alaska. *Canadian Journal of Botany*. Vol 47: 1085-1100.

Seo, S., Y. Tomita and Tori, K. 1975. Biosynthesis of ursene-type triterpenes from sodium [1,2-¹³C] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara and re-assignments of ¹³C n.m.r. signals in urs-12-enes. *Journal of the chemical society Chemical communications* Vol: 954-955.

Small, E. 1972. Photosynthetic rates in relation to nitrogen recycling as an adaptation to nutrient deficiency in peat bog plants. *Canadian Journal of Botany*. Vol 50: 2227-2233.

Smith, H. I. 1929. *Materia Medica of the Bella Coola and neighboring tribes of British Columbia*. National Museum of Canada Bulletin. Vol 56: 47-68.

Speck, F. G. 1917. Medicine practices of the Northeastern Algonquians. *Proceedings of the 19th International Congress of Americanists*. Pp. 303-321.

Stefanova, Z., H. Neychez, Ivanovska, N. and I. Kostova. 1995. Effect of a total extract from *Fraxinus ornus* stem bark and esculin on zymosan- and carrageenan-induced paw oedema in mice. *Journal of ethnopharmacology*. Vol 46: 101-106.

Swartz, H.M. 1978. Free radicals in cancer. *Ciba Foundation symposium*. Vol 67: 107-130.

Szabo, C., 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* 140-141, 105-112.

Takechi, M. And Y. Tanaka. 1993. Structure-activity relationship of synthetic methyl ursolate glycosides. *Phytochemistry*. Vol 34, 3: 675-677.

To, W.-K., A.W. Fothergill and Rinaldi, M.G. 1995. Comparative evaluation of microdilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal

susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 33: 2660-2664.

Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. Vol 552: 335-344.

Turner, N. C. and M.A.M. Bell. 1973. The ethnobotany of the Southern Kwakiutl Indians of British Columbia. *Economic Botany*. Vol 27: 257-310.

Turner, N.J., L.C. Thompson and Thompson, M.T. 1990. Thompson ethnobotany: knowledge and usage of plants by the Thompson Indians of British Columbia. Victoria. Royal British Columbia Museum.

Weng, X.C. 1991. Antioxidant components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bungee). Ph.D. thesis, Reading University, UK.

Zhang, J. and G.-T. Liu. 1984. The inhibitory effects of disodium semisuccinate of oleanolic acid on cytochromes P-450. *Chinese Pharmacological Bulletin*. Vol 1: 300-301.

Sites Internet

http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?ledum: United States department of agriculture, Species records in the GRIN database. Last update: septembre 19, 2005.

http://www.fapaq.gouv.qc.ca/fr/region/02_sag_lac/PDRRF/: Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune, Plan de développement régional associé aux ressources fauniques. Dernière modification : 27 août 2005.

<http://www.rook.org/earl/bwca/nature/shrubs/ledum.html#Top>: The Rook Family Home Page. Last update: march 2004.

<http://www.ct-botanical-society.org/galleries/ledumgroae.html>: Connecticut Botanical Society. Last update: august 28, 2005.

CHAPITRE 7

ANNEXES

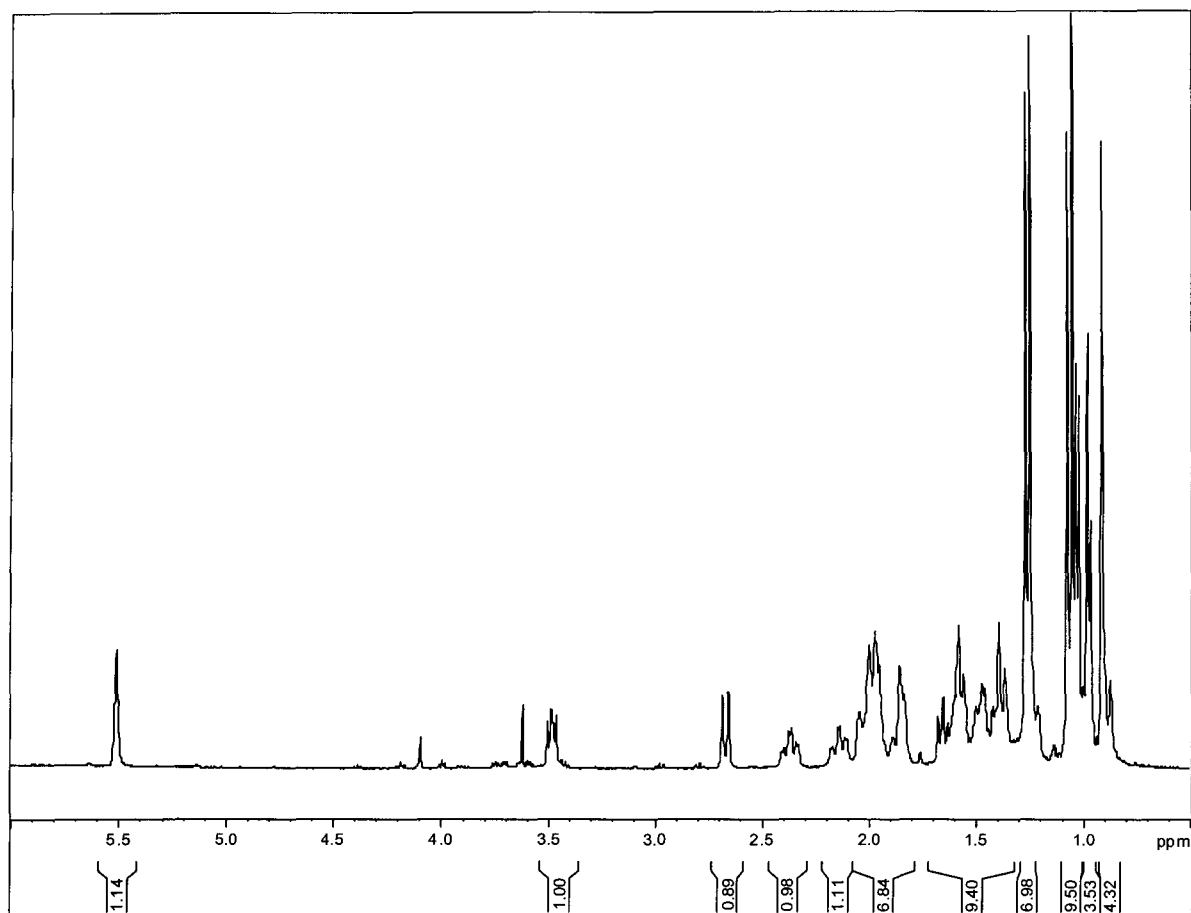


Figure 6 : Spectre de résonance magnétique nucléaire proton d'un inconnu isolé du *Ledum groenlandicum* Retzius

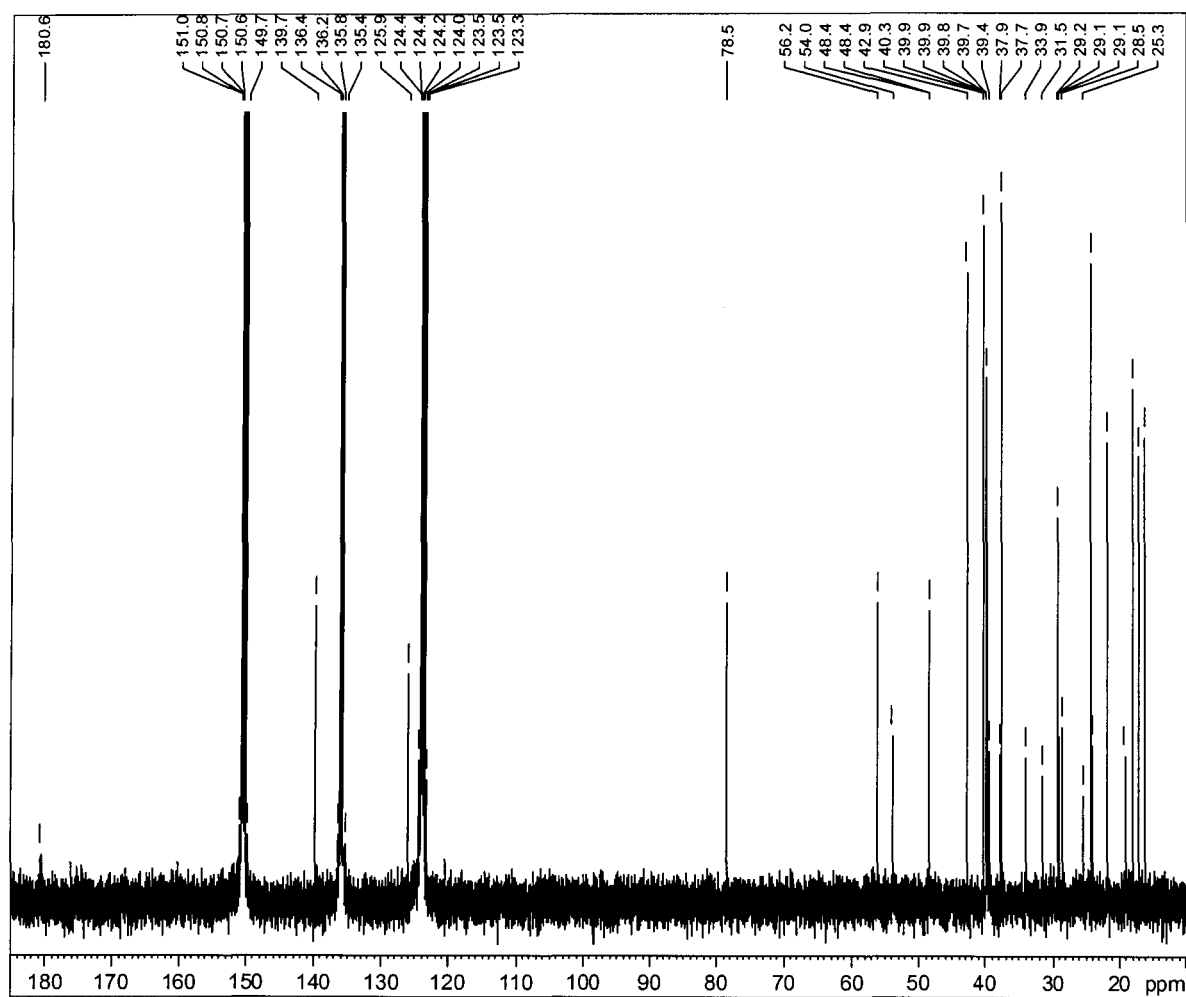


Figure 7 : Spectre de résonance magnétique nucléaire carbone d'un inconnu isolé du *Ledum groenlandicum* Retzius

Tableau 3 : Résultats des données RMN pour l'acide ursolique

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)		Multiplicité
1	38,8	1,59		CH ₂
2	27,9	1,86		CH ₂
3	77,9	3,49		CH
4	39,2	-		C
5	55,6	0,90		CH
6	18,6	1,60	1,39	CH ₂
7	33,4	1,59	1,39	CH ₂
8	37,1	-		C
9	47,8	1,67		CH
10	39,7	-		C
11	23,4	1,97		CH ₂
12	125,3	5,51		CH
13	139,1	-		C
14	42,3	-		C
15	30,9	1,49	1,41	CH ₂
16	24,7	2,15	2,03	CH ₂
17	47,8	-		C
18	53,4	2,67		CH
19	39,3	1,51		CH
20	39,2	1,02		CH
21	28,5	2,37		CH ₂
22	37,3	2,00		CH ₂
23	28,6	1,27		CH ₃
24	16,4	1,05		CH ₃
25	17,3	1,08		CH ₃
26	15,5	0,92		CH ₃
27	23,7	1,26		CH ₃
28	180,0	-		C
29	17,3	1,03		CH ₃
30	21,2	0,98		CH ₃

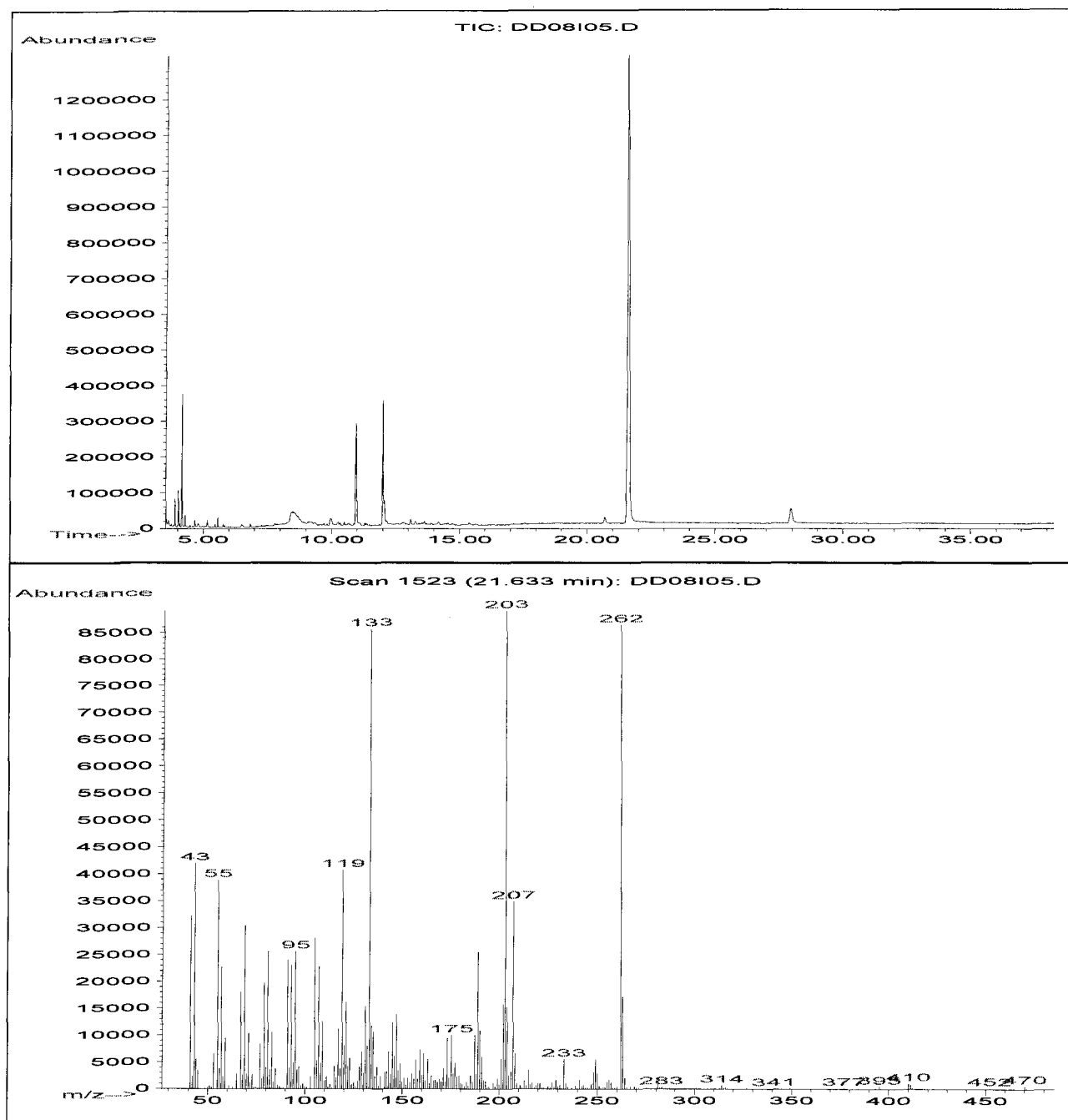


Figure 8 : Spectre de masse d'un standard d'acide ursolique

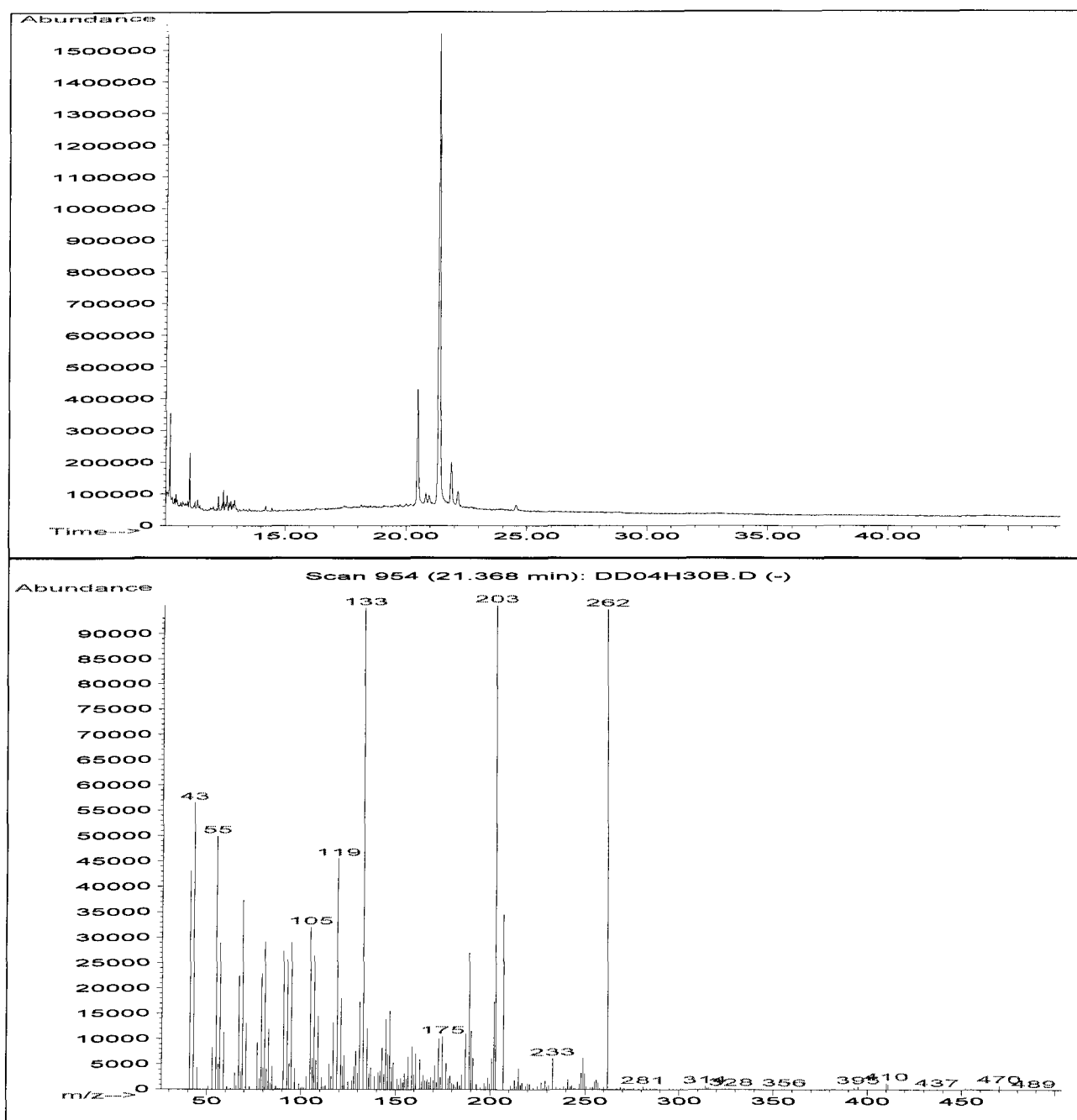


Figure 9 : Spectre de masse d'un inconnu isolé du *Ledum groenlandicum* Retzius

