

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR  
TOMMY PERRON

ÉTUDE DU POTENTIEL BIOACTIF DE LA *Brasenia schreberi*

AVRIL 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

La *Brasenia schreberi* est une plante aquatique retrouvée sur divers continents dans le monde dont l'Amérique du Nord. Utilisée comme aliment en Asie, ses usages thérapeutiques pour la guérison de certains cancers au début du XX<sup>ème</sup> siècle sont peu documentés. L'étude du potentiel bioactif de cette plante constitue l'objectif principal de cette recherche s'inscrivant dans le cadre d'un projet en cours à l'UQAC. Des spécimens ont été échantillonnés de façon aléatoire au lac Simoncouche dans la réserve faunique des Laurentides en août 2003. Les feuilles ont été séchées, broyées en fine poudre et les produits naturels ont été extraits selon une approche d'extraction séquentielle en utilisant des solvants de polarité croissante (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH et H<sub>2</sub>O). L'activité anticancéreuse des extraits de feuilles a été évaluée sur un carcinome du poumon (A-549) et un adénocarcinome du colon (DLD-1). Seuls les extraits méthanolique et aqueux ont montré une activité contre les cellules DLD-1. L'activité antioxydante a été évaluée sur cellules ainsi que par la méthode ORAC. La majorité des extraits ont démontré des activités pro- ou anti-oxydantes dépendamment des concentrations à l'étude. Les extraits aqueux et méthanolique, les plus intéressants au niveau de l'activité antioxydante, ont été purifiés afin d'identifier le ou les composés en partie responsables de l'activité. Ainsi, deux composés majoritaires ont été isolés par chromatographie sur gel de silice et par HPLC préparatif en phase inverse. La caractérisation par résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse de ces deux composés isolés a permis d'identifier le quercetin 7-O-β-glucoside (**1**) et l'acide gallique (**2**). De plus, la comparaison des facteurs de rétention de ces composés avec des standards et l'étude des comportements chimiques sous l'effet de divers réactifs ont appuyé les identifications spectrométriques. Les composés **1** et **2** ont tous deux démontré une activité antioxydante, tel que rapporté dans la littérature. Le composé **1** présente une activité ORAC similaire à son homologue, la quercetine, tout en étant non toxique aux mêmes concentrations. Par ailleurs, l'étude de l'activité anti-inflammatoire de **1**, en comparaison avec la quercetine, lui a attribué un potentiel semblable, mais avec une toxicité moindre. Le composé **2** est un antioxydant naturel relativement connu, et fréquemment utilisé dans le domaine pharmaceutique, principalement comme agent de conservation pour des médicaments sensibles à l'oxydation. Les analyses préliminaires de la plante ont aussi permis de noter l'abondance de composés phénoliques, tous aussi susceptibles de cacher des vertus thérapeutiques. Cette étude du potentiel bioactif de la *Brasenia schreberi* démontre ainsi une voie de valorisation de cette plante, souvent considérée comme envahissante du point de vue écologique.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur, Dr. André Pichette, pour m'avoir accueilli dans sa prestigieuse équipe de recherche, ainsi que Dr. Jean Legault et son équipe pour leur étroite collaboration. Ma reconnaissance s'adresse également aux docteurs Muriel Sylvestre et Vakhtang Mshvildadze pour m'avoir enseigné les réalités du monde de la phytochimie, au Dr. Michel Girard pour sa contribution à parfaire mon esprit déductif, ainsi qu'au Dr. Pascal Sirois et à son équipe pour leur participation au volet écologique.

Je remercie particulièrement les maîtres M<sup>me</sup> Josette Ross et M. Serge Lavoie qui m'ont permis d'approfondir différentes techniques spectrométriques; MM. Karl Lalancette, Maxime Lebrun et M<sup>me</sup> Angélique Longtin pour leur grande efficacité; les étudiants de premier cycle, M<sup>me</sup> Carole Grenon et M. Charles Sirois pour leur temps consacré à relever divers défis dans le cadre de mon projet; et toutes autres personnes ayant collaboré à l'avancement de mes travaux, sans oublier M<sup>me</sup> Valéry Roy-Lagacé pour son soutien inestimable en dehors du laboratoire.

En terminant, cette étude fut possible grâce au financement de la Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES ANNEXES .....	ix
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1 Problématique .....	2
1.2 Revue de littérature.....	4
1.2.1 Taxonomie et écologie de la <i>Brasenia schreberi</i> .....	4
1.2.2 Considérations phytochimiques.....	7
1.2.3 Activité biologique .....	12
1.3 Hypothèses et objectifs du projet de recherche .....	14
1.4 Structure du mémoire.....	15
1.5 Références.....	16
CHAPITRE II .....	20
ANTIOXYDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF QUERCETIN 7-O-	
β-GLUCOPYRANOSIDE FROM THE LEAVES OF A FRESH WATER PLANT,	
<i>Brasenia schreberi</i> .....	20
2.1 Abstract.....	21
2.2 Introduction.....	22

2.3 Materials and Methods.....	22
2.3.1 General experimental procedure.....	22
2.3.2 TLC, HPLC, and HPLC-MS conditions.....	23
2.3.3 Plant material .....	24
2.3.4 Extraction and isolation of compounds .....	24
2.3.5 ORAC <sub>FL</sub> assay.....	26
2.3.6 Cell culture.....	27
2.3.7 Antioxidant cell assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)....	27
2.3.8 Cytotoxicity assay.....	28
2.3.9 Nitrite oxide measurement.....	29
2.4 Results and Discussion .....	30
2.4.1 Evaluation of antioxidant activity of <i>B. schreberi</i> leaf extract and isolation of the main compounds.....	30
2.4.2 Identification of the main compounds from the leaves of <i>B. schreberi</i> .....	31
2.4.3 Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of quercetin 7- <i>O</i> - $\beta$ - glucopyranoside.....	32
2.4.4 Evaluation of anti-inflammatory and cytotoxic activities of quercetin-7- <i>O</i> - $\beta$ - glucopyranoside on murine RAW 264.7 macrophages .....	33
2.5 Acknowledgments .....	34
2.6 References.....	35
2.7 Table and figures .....	37
CHAPITRE III.....	42
RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	42
3.1 Échantillonnage .....	43
3.2 Extraction et isolation .....	43
3.3 Caractérisation .....	44
3.4 Évaluation de l'activité biologique d'extraits de <i>Brasenia schreberi</i> .....	48
3.4.1 Évaluation de la cytotoxicité des extraits .....	48
3.4.2 Activités antioxydante et anti-inflammatoire des composés isolés .....	49

3.5 Références.....	51
CHAPITRE IV.....	53
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	53
ANNEXES.....	56

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure caractéristique de la <i>Brasenia schreberi</i> .....	6
Figure 2.1. <i>B. schreberi</i> extracts and its constituents .....	37
Figure 2.2. Molecular structure of antioxidant compounds isolated from <i>B. schreberi</i> .....	38
Figure 2.3. Effect of quercetin and quercetin 7- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranoside on ROS production induced by tBH in L-929 cell lines .....	39
Figure 2.4. Cytotoxicity of quercetin and quercetin-7- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranoside on human fibroblast WS-1 .....	40
Figure 2.5. Anti-inflammatory activity of quercetin-7- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranoside .....	41
Figure 3.1. Fragmentation du lien glycosidique de <b>1</b> .....	45
Figure 3.2. Fragmentation du lien polyphénol-acide de <b>2</b> .....	45



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Antioxidant activity of <i>B. schreberi</i> extracts and its constituents using	
	ORAC <sub>FL</sub> assay.....	38
Tableau 3.1	Évaluation de l'activité anticancéreuse des extraits bruts .....	49

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Chromatogrammes des séparations par HPLC préparatif .....	57
ANNEXE 2 : Spectres de masse APCI (mode négatif) .....	58
ANNEXE 3 : Spectres de masse HR ESI (mode positif) .....	59
ANNEXE 4 : Spectres UV de 210 à 400 nm .....	61
ANNEXE 5 : Spectres IR de 4000 à 450 cm <sup>-1</sup> .....	62
ANNEXE 6 : Spectres RMN de la molécule 1 dans (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO .....	63
ANNEXE 7 : Spectres RMN de la molécule 2 .....	67
ANNEXE 8 : Liste des abréviations .....	71

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

## 1.1 Problématique

Le cancer est actuellement la première cause de mortalité au Canada (69 500 décès en 2005). De plus, le nombre de nouveaux cas est en hausse (149 000). Cette augmentation est principalement attribuable à la croissance démographique et au vieillissement de la population [1]. Dans de nombreuses occasions, la médecine traditionnelle de différentes cultures a amené les gens à se tourner vers des plantes ayant des vertus thérapeutiques. En Amérique du Nord, les produits naturels (incluant leurs dérivés et analogues) représentent plus de 50 % de tous les médicaments d'usage clinique [2].

Selon une estimation conservatrice, le nombre de plantes florissantes sur la planète Terre est de 250 000 [3]. Seul un faible pourcentage de ces espèces ont été étudiées pour leur potentiel médicinal et biologique. En 1985, le nombre de composés isolés et utiles du point de vue thérapeutique était d'environ 120 [4]. Depuis des siècles, les Cris, Dénés et Métis vivant dans la région forestière boréale du Nord-Ouest canadien utilisent des plantes comme aliments ou comme médicaments, parmi lesquelles se retrouvent aussi des espèces aquatiques de la famille des Nymphaeacées [5]. Des plantes de cette famille ont d'ailleurs démontré diverses activités biologiques intéressantes comme la *Euryale ferox* pour son activité antioxydante [6], la *Nymphaea alba* pour son activité anticarcinogénique [7] et la *Nuphar pumilum* pour l'activité immunosuppressive de ses rhizomes [8]. Dans plusieurs

cas, les effets reliées au potentiel antioxydant (anticarcinogénique ou autres) sont attribuables à la présence de composés phénoliques, comme les flavonoïdes, qui agissent comme piègeurs de radicaux libres [9].

À la station de recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi, des chercheurs en écologie aquatique se sont intéressés à l'invasion progressive du lac Simoncouche par la *Brasenia schreberi* au cours des vingt dernières années [10], ce qui constitue un enjeu écologique important [11]. L'envergure de cette production naturelle massive a suscité l'intérêt des chercheurs du laboratoire LASEVE à évaluer les propriétés biopharmaceutiques de la plante dans le but d'en faire la valorisation, ce qui fût appuyé par la Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi [12].

Les usages thérapeutiques de la *Brasenia schreberi* ont été très peu étudiés, bien qu'elle aurait été utilisée au début du XX<sup>ème</sup> siècle pour le traitement de certains cancers en Chine et au Japon [13]. Les usages alimentaires de la plante sont communs dans les pays d'Asie. Elle est comptée parmi les ingrédients de la *miso-shiru* (soupe miso), produite au Japon, tandis qu'en Chine on la fait frire avant consommation [14]. La composition chimique de la *Brasenia schreberi* est jusqu'à maintenant peu connue, à l'exception de la couche gélatineuse caractéristique qui enveloppe toutes les parties immergées de la plante, dans laquelle la composition en polysaccharides a été caractérisée [15]. Par ailleurs, la présence de polyamines peu usuelles a été rapportée dans les feuilles [16].

Le nombre limité d'études indique que la composition phytochimique et le potentiel biopharmaceutique de la *Brasenia schreberi* sont relativement peu connus. Ce travail vise donc l'amélioration des connaissances phytochimiques et l'évaluation partielle du potentiel biopharmaceutique de cette matrice végétale.

## 1.2 Revue de littérature

### 1.2.1 Taxonomie et écologie de la *Brasenia schreberi*

La *Brasenia schreberi* J.F. Gmel. est une plante aquatique retrouvée principalement dans l'est de l'Asie, en Australie, en Afrique ainsi qu'en Amérique du Nord et Centrale [17]. Elle est la seule espèce du genre *Brasenia*, en l'honneur de Christoph Brasen, 1774, un missionnaire morave et un collecteur de plante au Groenland et au Labrador. Du Latin « de Schreber », *schreberi* rapporte le nom du botaniste allemand Johann Christian von Schreber, 1739–1810 [18]. Deux synonymes sont connus pour cette plante : *B. peltata* Pursh et *B. purpurea* Casp. [19], bien que plusieurs noms communs soient couramment utilisés : Dollar Bonnet, Purple Wen-Dock, Schreber's Watershield, brasénie de Schreber (Québec), Junsai (Japon), Shun-ts'ai et shui-k'uei (Chine), Water Target, Deer Food, Little Water Lily, Frog Leaf et Fanwort [14, 18, 20]. Elle est habituellement classée dans la famille des Nymphaacées (Nymphaeaceae), aussi appelée « Water-Lily family », représentant la famille des lys d'eau. Elle fait partie de la sous-famille des Cabombaceae

comprenant les genres *Cabomba* et *Brasenia*, laquelle est considérée comme une famille indépendante par certaines classifications [17].

Les Nymphaçées comptent cinq genres et une cinquantaine d'espèces, toutes dans les eaux douces. La brasénie (figure 1.1) est une plante aquatique à rhizome grêle et rampant. La tige est grêle, longue et ramifiée, et couverte d'une substance mucilagineuse, tout comme la face inférieure des feuilles. Les feuilles sont ovales (5-10 cm x 4-5 cm) et flottantes, les fleurs sont pourpres et axillaires (diam. = 10-12 mm). Elle est retrouvée dans les eaux mortes, acide ou non, et ne se retrouve plus que par stations isolées en dehors de l'Amérique [19]. La *Brasenia schreberi* se rencontre aussi abondamment à l'état fossile dans les dépôts interglaciaires de l'Europe, d'où elle est complètement disparue, elle constitue donc un type végétal cosmopolite à l'époque tertiaire [21].

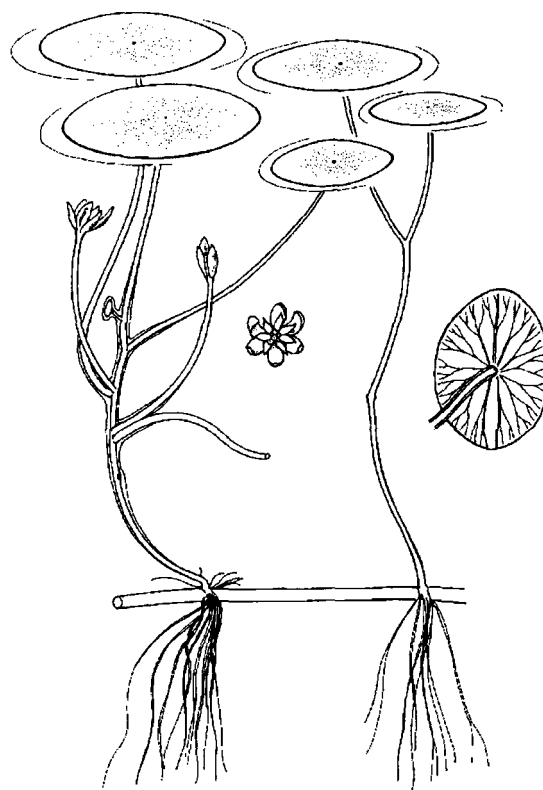


Figure 1.1. Structure caractéristique de la *Brasenia schreberi* [22]

Cette plante est reconnue pour sa grande capacité à former des colonies très denses [11]. Dans les étangs et les lacs, la brasénie peut rapidement devenir l'espèce dominante et ses feuilles peuvent en couvrir entièrement la surface. Lorsqu'elle s'établit dans un secteur, la croissance des autres plantes peut être inhibée par l'effet d'ombrage créé par les feuilles flottantes. De très denses populations de brasénie peuvent même entraver la navigation et restreindre les usages récréatifs d'un plan d'eau [23, 24]. Une étude portant sur l'expansion spatio-temporelle de la brasénie dans le lac Simoncouche (Parc des Laurentides, Québec, Canada) entre 1983 et 2004 a démontré un taux d'accroissement moyen de 6569 m<sup>2</sup>/année,



soit une superficie occupée par la plante 2,8 fois plus importante en 2004 par rapport à 1983 [10].

### 1.2.2 Considérations phytochimiques

La faculté qu'ont les végétaux de synthétiser leur biomasse à partir de molécules minérales simples est appelée l'autotrophie végétale et repose sur des pigments assimilateurs, les chlorophylles, localisées dans un organite appelé chloroplaste. C'est en 1818 que deux pharmaciens, Pelletier et Caventou, proposèrent d'appeler ainsi (du grec *khlôros*, vert et *phyllon*, feuille) le « principe vert » des feuilles [25]. Les chlorophylles sont des composés cycliques de type tétrapyrrole avec un atome de magnésium chélaté au centre et elles sont en partie responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse des plantes. D'autres pigments photosynthétiques sont souvent retrouvés dans les plantes aquatiques tels les caroténoïdes, les complexes protéine - chlorophylle/caroténoïde et les biliprotéines dans certaines algues [26].

En 1891, Emil Fischer annonçait l'élucidation de la structure du glucose (Prix Nobel de chimie en 1902). Cette découverte a grandement contribué à l'étude des voies métaboliques des végétaux. Les produits naturels sont divisés en deux grandes classes : les métabolites primaires et secondaires, division qui s'avère utile, bien que quelque peu arbitraire. Les métabolites primaires, i.e. glucides, nucléosides, acides aminés et polymères

dérivés de ceux-ci, sont les composés les plus abondants et sont considérés essentiels à la vie de la plante. Les métabolites secondaires quant à eux, i.e. phénoliques, terpènes, stéroïdes et alcaloïdes, sont en présence restreinte et n'ont pas d'utilité apparente. Les hydrates de carbone produits par la photosynthèse constituent le centre de toutes les voies métaboliques primaires et secondaires [27, 28]. La diversité et la complexité des métabolites secondaires biosynthétisés, à l'aide d'enzymes et de cofacteurs, représente une ressource biopharmaceutique importante dans la pratique de la médecine moderne. Plusieurs médicaments d'usage courant sont d'ailleurs des produits naturels, ou des entités synthétiques élaborées à partir de squelettes de ceux-ci (NM « Natural Product Mimic ») [29].

Deux voies sont connues pour la biosynthèse de composés aromatiques naturels, une première basée sur l'acide shikimique et l'autre sur l'acide acétique [30]. La grande majorité des composés aromatiques naturels retrouvés dans les plantes sont de type phénolique, comprenant les phénols simples, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les tannins et les quinones [31]. Plus de 8 000 polyphénols provenant de plantes sont actuellement connus, et les flavonoïdes en constituent le plus grand groupe [27].

Une approche efficace dans la recherche de composés d'intérêt biopharmaceutique consiste en un fractionnement guidé par la bioactivité [32]. Suite à un échantillonnage, la première étape précédant l'extraction de composés chimiques dans une plante aquatique de la famille des Nymphacées est habituellement un séchage à l'air [33, 34]. La teneur en eau

des feuilles de *Brasenia schreberi*, incluant le gel mucilagineux, a été évaluée à 98 % [15]. De plus, il est recommandé de broyer le matériel végétal en fines particules avant extraction. L'augmentation du rapport surface/masse et l'homogénéisation de la matière solide permettent d'améliorer les rendements et la reproductibilité des extractions [35].

Plusieurs approches sont couramment utilisées pour extraire les métabolites secondaires d'une matrice végétale. L'extraction à l'aide de solvants est l'une des plus utilisées et elle permet plusieurs variantes telles que l'extraction par macération, par sonication, à reflux, par Soxhlet, etc. L'extraction par Soxhlet est très répandue et elle permet de récupérer le maximum de produits dans des conditions optimales (temps d'extraction, nature du solvant, etc.) [36]. Cette approche permet d'effectuer des lixiviations successives du matériel végétal avec du ou des solvants fraîchement distillés. Cette dernière permet également d'effectuer des extractions séquentielles avec des solvants de polarité croissante. Ainsi, il est possible d'utiliser successivement plusieurs solvants de polarité croissante (généralement du moins au plus polaire) sur le même échantillon afin d'extraire efficacement les produits naturels de polarité variable. À titre d'exemple, le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), le méthanol ( $\text{MeOH}$ ) et l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) pourraient être utilisés dans cet ordre en tenant compte de leurs indices de polarité respectifs (3,1; 5,1; et 9,0) [37].

Les extraits bruts obtenus directement d'une matrice végétale contiennent des métabolites secondaires de différentes familles. Certaines de ces familles de composés peuvent s'avérer nuisibles lors de la purification ou de l'évaluation de l'activité biologique.

Les chlorophylles, les lipides et les sucres sont souvent considérés comme des produits nuisibles [38]. Les extraits bruts sont généralement soumis à un traitement rapide (filtration, partition, etc.) afin de se débarrasser de ces produits indésirables [39].

Depuis l'invention de la chromatographie par le scientifique russe Tswett en 1903, cette technique n'a cessé d'être améliorée [40]. La chromatographie sur colonne de gel de silice convient habituellement au fractionnement primaire d'un extrait brut. Par la suite, les fractions peuvent être purifiées sur colonne (par gravité) en utilisant un adsorbant approprié. Diverses techniques permettent d'accroître la résolution, c'est le cas de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cet appareillage, par un mode de détection non destructif (ex. : UV), permet la récupération de produits purifiés, lesquels peuvent ensuite être analysés par les techniques spectrométriques usuelles : RMN, MS, IR, UV, etc. Ces mêmes composés purs peuvent alors être soumis directement à des tests de bioactivité. Par ailleurs, l'usage d'une CCM préparative au départ peut aider à cibler rapidement un ou des groupes de composés actifs, bien que la concentration des produits testés est difficilement évaluable par cette méthode.

L'élucidation de la structure des produits isolés est réalisée à l'aide d'informations spectroscopiques. La résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse donnent généralement les informations les plus pertinentes. La spectrométrie de masse permet souvent de déterminer la formule moléculaire (données de masse exacte) d'un composé. De plus, le spectre obtenu (abondance en fonction du rapport de la masse sur la charge) de la

fragmentation de l'ion moléculaire d'un composé donne des informations structurales utiles pour l'identification [41-43]. La résonance magnétique nucléaire permet généralement de déterminer l'environnement chimique et la connectivité des différents atomes (carbone, proton, etc.) d'un composé [44, 45]. Ces informations structurales sont indispensables à l'élucidation de la structure chimique d'un composé.

### 1.2.3 Activité biologique

Le fractionnement d'extraits guidé par l'activité biologique est fréquemment utilisé pour l'identification rapide des produits naturels bioactifs [32]. Des interactions entre les composés à l'état de mélange sont susceptibles d'affecter le niveau d'activité d'un extrait. Il est important d'en prendre considération tout au long du processus d'isolation de composés bioactifs. Des phénomènes de synergie sont souvent observés dans les extraits bioactifs. Ce phénomène s'observe lorsqu'au moins deux composés possédant le même type de bioactivité contribuent à une activité globale plus grande que la somme de leurs effets individuels. Le phénomène de potentialisation peut également être observé. Un composé est considéré comme un agent potentialisateur lorsqu'il ne manifeste pas la même activité que la substance qui bénéficie de sa présence. Par exemple, une molécule ne démontrant pas d'activité anticancéreuse qui favorise l'accumulation d'un agent anticancéreux au niveau cellulaire est considérée comme un agent potentialisateur. L'effet antagoniste est aussi possible, soit le contraire de la synergie, et il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins important que les effets individuels [46].

Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a fait état de la présence de composés bioactifs de la *Brasenia schreberi*, bien que certaines vertus thérapeutiques de cette plante aient été publiées dans le début du XX<sup>e</sup> siècle, en rapport avec le cancer en général (Chine, 1911) et le cancer de l'estomac (Japon, 1935) [14]. D'autres espèces de la famille des

Nymphaeacées ont par contre été étudiées récemment par rapport à leur composition chimique et à leur potentiel biopharmaceutique : la *Nymphaea stellata* pour son effet anti-hépatotoxique [47], la *Nuphar pumilum* pour l'activité anti-métastatique de sesquiterpènes thioalcaloïdes du rhizome [48], la *Nymphaea lotus* pour ses flavonoïdes antioxydants [49], la *Nymphaea odorata* pour ses composés phénoliques piègeurs de radicaux [50], la *Euryale ferox* pour son activité antioxydante [6] et la *Nymphaea alba* pour son effet anticarcinogénique contre les dommages oxydatifs [7]. D'une façon générale, les composés phénoliques ont souvent été identifiés dans les plantes de la famille des Nymphaeacées.

Les composés phénoliques forment un groupe très diversifié et sont synthétisés dans la nature par les végétaux et les micro-organismes. Les organismes animaux doivent puiser ces composés de leur alimentation (ou d'une symbiose), puisqu'ils sont essentiels à l'élaboration de métabolites indispensables comportant un noyau aromatique comme élément structural (ex. : acides aminés, vitamines, pigments, toxines) [10].

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur importante activité antioxydante, laquelle est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers [51]. Certains d'entre eux, tel que les coumarines, possèdent des propriétés anti-inflammatoires [52]. D'autres, tel que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques [53]. Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phénoliques, protègent

les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété « vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémians, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques. Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques. Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général [9].

### 1.3 Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Une étude phytochimique et une évaluation de l'activité biologique de la *Brasenia schreberi* devraient mettre en valeur le potentiel biopharmaceutique de la plante. L'objectif principal de ce projet vise à étudier le potentiel biopharmaceutique de la *Brasenia schreberi*, et les objectifs spécifiques sont :

- Évaluer l'activité biologique (anti-cancéreuse, antioxydante et toxicité) d'extraits de feuilles de *Brasenia schreberi*.
- Isoler et identifier les composés majoritaires, en partie responsables de l'activité d'intérêt.



- Rechercher diverses activités biologiques des composés isolés.

Les produits naturels seront extraits par solvants en utilisant une approche par gradient de polarité. Ainsi, les composés seront fractionnés grossièrement en fonction de leur structure. Les composés majoritaires seront isolés dans les extraits actifs à l'aide de différentes techniques chromatographiques, et seront ensuite identifiés par diverses méthodes spectroscopiques. Différentes activités biologiques des composés isolés seront évaluées afin de compléter l'étude préliminaire du potentiel biopharmaceutique de cette plante dans un but de valorisation.

#### **1.4 Structure du mémoire**

Le mémoire comprend deux chapitres principaux (II et III) et une conclusion générale (chapitre IV). Le chapitre II est rédigé en anglais sous forme d'article scientifique et porte sur l'isolation et la caractérisation de composés bioactifs. La partie expérimentale de ce chapitre constitue une description détaillée des méthodologies d'extraction, d'isolation et de caractérisation. L'étude des activités biologiques y est aussi décrite. Les résultats y sont discutés et le potentiel biopharmaceutique de la plante y est mis en évidence. *Note : Ce chapitre est le fruit du travail du candidat en collaboration avec les docteurs André Pichette et Jean Legault.*

Le chapitre III aborde les résultats supplémentaires au chapitre II et discute des résultats obtenus en comparaison avec la littérature scientifique. La conclusion générale (chapitre IV) reprend l'essentiel des chapitre II et III pour en faire ressortir les liens avec les objectifs présentés à la section 1.3.

## 1.5 Références

- <sup>1</sup> Société canadienne du cancer/Institut national du cancer, 2005. Statistiques canadiennes sur le cancer 2005. Montréal, 120 p.
- <sup>2</sup> Balandrin, M.F., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R., 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. ACS Symposium Series 534, 2-12.
- <sup>3</sup> Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., 1985. Potential consequences of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. Econ. Bot. 39 (3), 231-240.
- <sup>4</sup> Farnsworth, N.R., Akelere, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. Bull. WHO 63, 965-981.
- <sup>5</sup> Marles, R.J., Clavelle, C., Monteleone, L., Tays, N., Burns, D., 2000. Aboriginal Plant Use in Canada's Northwest Boreal Forest. UBC Press, Georgtown, 368 pp.
- <sup>6</sup> Lee, S.E., Ju, E.M., Kim, J.H., 2002. Antioxydant activity of extracts from *Euryale ferox* seed. Exp. Mol. Med. 34 (2), 100-106.
- <sup>7</sup> Khan, N., Sultana, S., 2005. Anticarcinogenic effect of *Nymphaea alba* against oxidative damage, hyperproliferative response and renal carcinogenesis in Wistar rats. Mol. Cell. Biochem. 271 (1-2), 1-11.
- <sup>8</sup> Yamahara J., Shimoda H., Matsuda H., Yoshikawa M., 1996. Potent immunosuppressive principles, dimeric sesquiterpene thioalkaloids, isolated from nupharis rhizoma, the rhizoma of *Nuphar pumilum* (nymphaeaceae): structure-requirement of nuphar-alkaloid for immunosuppressive activity. Biol Pharm Bull., 19 (9), 1241-3.
- <sup>9</sup> Bruneton, J., 1993. Pharmacognosie. Technique et documentation – Lavoisier, Paris, p. 278.
- <sup>10</sup> Bourque, M., Cleary, D., Lévesque S., 2004. Expansion spatio-temporelle de la brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi*) dans le lac Simoncouche entre 1983 et 2004. Module des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 11 pp.

- <sup>11</sup> Lamoureux, G., Groupe Fleurbec, 1987. Plantes sauvages des lacs, rivières et tourbières. Groupe Fleurbec, Saint-Augustin, 399 pp.
- <sup>12</sup> Fondation de l'UQAC: Subventions régulières 2004-2005 © 2004 [En ligne] Chicoutimi, Canada: Université du Québec à Chicoutimi. <[http://www.uqac.ca/uqac\\_en\\_bref/fondation\\_uqac/subventions\\_reg.php](http://www.uqac.ca/uqac_en_bref/fondation_uqac/subventions_reg.php)> Consulté le 2004.10.19.
- <sup>13</sup> Hartwell, J.L., 1982. Plants Used Against Cancer. Quaterman Publications, Inc., Lawrence, 30-34.
- <sup>14</sup> Brasenia © 2004. [En ligne] Minnesota, USA: Boundary Waters Canoe Area Wilderness. <<http://www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/brasenia.html>> Consulté le 2004.10.18.
- <sup>15</sup> Misaki, A., Smith, F., 1962. Structure of the Polysaccharide of the Japanese Water Plant, *Brasenia schreberi* J.F. Gmel. J. Agric. Food Chem. 10 (2), 104-108.
- <sup>16</sup> Hamana, K., Niitsu, M., Samejima, K., 1998. Unusual polyamines in aquatic plants: the occurrence of homospermidine, norspermidine, thermospermine, norspermine, aminopropylhomospermidine, bis(aminopropyl)ethanediamine, and methylspermidine. Can. J. Bot. 76, 130-133.
- <sup>17</sup> Wiersema, J.H., 1997. Flora of North America. Oxford University Press, Oxford, pp. 78-80.
- <sup>18</sup> Fernald, M.L., 1970. Gray's Manual of Botany, 8<sup>th</sup> ed. D. Van Nostrand Company, New York, p. 641.
- <sup>19</sup> Brouillet, L., Goulet, I., 1995. Flore laurentienne, 3<sup>e</sup> éd. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, pp. 237-240.
- <sup>20</sup> Watershield © 2004. [En ligne] ® Littleflower Publications. <[http://www.geocities.com/littleflowers\\_medicinal\\_plants/watershield.htm](http://www.geocities.com/littleflowers_medicinal_plants/watershield.htm)> Consulté le 2004.10.21.
- <sup>21</sup> Dansereau, P., Raymond, M., 1953. The Geographical Distribution of the Bipolar Nymphaeaceae, Nymphaea tetragonal, and Brasenia schreberi, Proceeding of the Seventh Pacific Science Congress 5, 122-131.
- <sup>22</sup> Cabombaceae © 2004. [En ligne] Saranac Lake, USA : Cedar Eden Environmental, LLC. <<http://www.cedareden.com/aquaplants/cabombaceae.html>> Consulté le 2004.10.23.
- <sup>23</sup> Tarver, D.P., Rogers, J.A., Mahler, M.J., Lazor, R.L., 1986. Aquatic and Wetland Plants of Florida, 3<sup>rd</sup> ed. Florida Department of Natural Resources, Tallahassee.
- <sup>24</sup> Hoyer, M.V., Canfield, Jr., D.E., Horsburgh, C.A., Brown, K., 1996. Florida Freshwater Plants – A Handbook of Common Aquatic Plants in Florida Lakes. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville.
- <sup>25</sup> Guignard, J.-L., 2000. Biochimie végétale, 2<sup>e</sup> éd. Dunod, Paris, p. 3.
- <sup>26</sup> Kirk, J.T.O., 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, New York, 509 pp.
- <sup>27</sup> Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V., Harborne, J.B., 1994. Natural products: their chemistry and biological significance. Pearson Education Limited, Harlow, 455 pp.

- 28 Torssell, K.B.G., 1997. Natural Product Chemistry: A Mechanistic, biosynthetic and ecological approach, 2<sup>nd</sup> ed. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 480 pp.
- 29 Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66 (7), 1022-37.
- 30 Ollis, W.D., 1961. Chemistry of Natural Phenolic Compounds. Pergamon Press, New York, 237 pp.
- 31 Kaufman, P.B., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., Brielmann, H.L., 1999. Natural Products from Plants. CRC Press, New York, 343 pp.
- 32 Cordell, G.A., Farnsworth, N.R., Beecher, C.W.W., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., Wall, M.E., Wani, M.C., Brown, D.M., O'Neill, M.J., Lewis, J.A., Tait, R.M., Harris, T.J.R. in Kinghorn, A.D. and Balandrin, M.F., (Eds), 1993. Human Medicinal Agents from Plants. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 191-204.
- 33 Miyazawa, M., Yoshio, K., Ishikawa, Y., Kameoka, H., 1998. Insecticidal Alkaloids against *Drosophila melanogaster* from *Nuphar japonicum* DC. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1059-1063.
- 34 Zhao, H., Zhao, S., 1994. New Cerebrosides from *Euryale ferox*. *J. Nat. Prod.* 57 (1), 138-141.
- 35 Anderson, R., 1987. Sample Pretreatment and Separation. John Wiley & Sons, New York, 632 pp.
- 36 Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., 1997. Practical HPLC Method Development, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 765 pp.
- 37 Solvent Polarity and Miscibility © 2003. [En ligne] Phoenix, USA: Western Cotton Research Laboratory (WCRL).  
<<http://www.wcrl.ars.usda.gov/cec/java/solvents.htm>>  
Consulté le 2004.10.28.
- 38 Kylin, H., Sjödin, A., 2003. Accumulation of Airborne Hexachlorocyclohexanes and DDT in Pine Needles. *Environ. Sci. Technol.* 37 (11), 2350-2355.
- 39 Wong, K.-H., Cheung, P.C.K., Wu, J.-Z., 2003. Biochemical and Microstructural Characteristics of Insoluble and Soluble Dietary Fiber Prepared from Mushroom *Sclerotia* of *Pleurotus tuber-regium*, *Polyporus rhinocerus*, and *Wolfiporia cocos*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7197-7202.
- 40 Jönsson, J.A., 1987. Chromatographic Theory and Basic Principles. Marcel Dekker, Inc., New York, 396 pp.
- 41 March, R.E., Miao, X.-S., Metcalfe, C.D., Stobiecki, M., Marczak, L., 2004. A fragmentation study of an isoflavone glycoside, genistein-7-*O*-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 232, 171-183.
- 42 March, R.E., Miao, X.-S., 2004. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry* 231, 157-167.
- 43 Domon, B., Costello, C.E., 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate* 5, 397-409.

- <sup>44</sup> Agrawal, P.K., 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31 (10), 3307-3330.
- <sup>45</sup> Markham, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, New York.
- <sup>46</sup> Klaassen, C.D., 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Professional, New York, 1275 pp.
- <sup>47</sup> Bhandarkar, M.R., Khan, A., 2004. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J. Ethnopharmacol.* 91 (1), 61-4.
- <sup>48</sup> Matsuda, H., Morikawa, T., Oda, M., Asao, Y., Yoshikawa, M., 2003. Potent anti-metastatic activity of dimeric sesquiterpene thioalkaloids from the rhizome of *Nuphar pumilum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (24), 4445-9.
- <sup>49</sup> Saleem, A., Ahotupa, M., Pihlaja, K., 2001. Total phenolics concentration and antioxidant potential of extracts of medicinal plants of Pakistan. *Z Naturforsch.* 56 (11-12), 973-8.
- <sup>50</sup> Zhang, Z., ElSohly, H.N., Li, X.C., Khan, S.I., Broedel, S.E.Jr., Raulli, R.E., Cihlar, R.L., Rurandt, C., Walker, L.A., 2003. Phenolic compounds from *Nymphaea odorata*. *J. Nat. Prod.* 66 (4), 548-50.
- <sup>51</sup> Karakaya, S., 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6), 453-64.
- <sup>52</sup> Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Nicolaides, D.N., 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* 10 (30), 3813-33.
- <sup>53</sup> Habtemariam, S., 2003. Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon.* 41 (6), 723-7.

## CHAPITRE II

ANTIOXYDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF QUERCETIN 7-O-  
 $\beta$ -GLUCOPYRANOSIDE FROM THE LEAVES OF A FRESH WATER PLANT,  
*Brasenia schreberi*

Tommy Perron, André Pichette, Karl Girard-Lalancette, Angélique Longtin, Pascal Sirois,  
Jean Legault

(Soumis le 20 octobre 2005 au journal Planta Medica)

## 2.1 Abstract

*Brasenia schreberi* Gmel. (Cabombaceae) is an aquatic plant which grows in eastern Asia, Australia, Africa, and North and Central America. *B. schreberi* leaf extracts were obtained by sequential solvent extraction with dichloromethane, methanol, and water. The antioxidant potential of each extract was assessed using the ORAC assay. The methanol and water extracts were found to be active, with ORAC values of  $7 \pm 2$  and  $5.1 \pm 0.5$   $\mu\text{mol TE/mg}$  respectively. Two major phenolic compounds, quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside and gallic acid, were respectively isolated from the methanolic and water extracts. Both compounds were found to exhibit antioxidant activities, in particular quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside, with an ORAC value of  $18 \pm 4$   $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ . In contrast to its well-known antioxidant homologue quercetin, quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside does not inhibit the growth of human fibroblasts (WS-1) or murine macrophages (RAW 264.7). Some flavonoids have been reported to possess beneficial effects on cardiovascular diseases and chronic inflammatory diseases associated with nitric oxide (NO) overproduction. Quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside inhibited NO release by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner.

## 2.2 Introduction

*Brasenia schreberi* Gmel. (Cabombaceae), also known as Water-shield, is an aquatic plant which grows in eastern Asia, Australia, Africa, and North and Central America. Its rootstalk is long and crawls along the muddy bottom. The long stem trails in the water and is covered with short hairs that produce a mucilaginous substance which entirely covers the stem and the underside of the leaves. The 5 to 10 cm long and 4 to 5 cm wide oval, smooth and unnotched leaves are alternate and float on the surface of the water [1, 2]. The mucilaginous coating of the plant has been intensively studied and is mainly composed of polysaccharides [3]. In folk medicine, *B. schreberi* is used in the treatment of cancer, particularly stomach cancer [4]. The crushed leaves are applied to abscesses and boils [5] and are also used in the treatment of dysentery and tuberculosis [6]. In this work, we have investigated the antioxidant and anti-inflammatory activities of compounds isolated from the leaves of *B. schreberi*.

## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 General experimental procedure

IR spectra were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FTIR as KBr pellets. NMR spectra were recorded in deuterated dimethylsulfoxide or deuterium oxide on a Bruker Avance 400 spectrometer (5 mm QNP with Z-gradient probe) operating at



400.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 100.61 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). The spectra were referenced to TMS as internal standard (ppm). All HPLC analytical investigations were carried out with an Agilent 1100 series (Agilent Technologies Canada Inc.) HPLC-MS system equipped with a vacuum degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostated column compartment and a diode array detector. UV spectra were extracted directly from the DAD signal. APCI analyses were performed with an Agilent 1100 LC/MSD quadrupole mass spectrometer, nitrogen was used as a nebulizing gas at a pressure of 35 psig, a flow rate of  $12\text{ L min}^{-1}$ , a temperature of  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a capillary voltage of 2 kV, a fragmentor voltage of 100 V and a corona current of  $15\text{ }\mu\text{A}$ . The preparative HPLC was carried out with an Agilent 1100 system equipped with an autosampler, two preparative pumps, a DAD and a fraction collector. The accurate mass determination was carried out with an MDS Sciex QSTAR XL QqTOF MS system (Applied Biosystems, Ontario, Canada) and equipped with an ESI Micromass GC-TOF MS system source (Waters, Manchester, UK).

### 2.3.2 TLC, HPLC, and HPLC-MS conditions

The TLC plates (silica gel ultra pure  $250\mu\text{m}$ , F254) were supplied by Silicycle (QC, Canada). The TLC mobile phases were  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (26:14:3) for compounds **1** and **2**;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (50:25:5) for sugars and  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (25:1) for aglycones. Detection of phenolic compounds was carried out by spraying natural products with polyethylene glycol (NP/PEG) reagent and observing under UV light (365, 254 nm). Other compounds were detected using a 0.2 % naphthoresorcinol in  $\text{EtOH} - 85\text{ }\%\text{ H}_3\text{PO}_4$  (22:1)

spray reagent and observing under visible light [7]. HPLC analyses were carried out with a ZORBAX Eclipse® XDB-C8 analytical column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm), a flow rate of 1.0 ml  $\text{min}^{-1}$  and a column temperature of 22 °C. An injection volume of 10  $\mu\text{L}$  of the sample dissolved in DMSO (2 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) was used.. Preparative HPLC was performed with a ZORBAX Eclipse® XDB-C8 semi-preparative column (5  $\mu\text{m}$ , 9.4 x 250 mm) and a flow rate of 4 ml  $\text{min}^{-1}$ . Sample concentration was 50 mg  $\text{ml}^{-1}$  in DMSO. MS spectra of purified compounds were obtained through direct injection using MeOH as the mobile phase.

### 2.3.3 Plant material

*Brasenia schreberi* was collected in August 2003 in the Saguenay region, Québec, Canada. Plants were identified by Mr. Patrick Nadeau of the Laboratoire d'Écologie Végétale, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. A voucher specimen (QFA-368450) was deposited in the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec, Canada.

### 2.3.4 Extraction and isolation of compounds

The air-dried leaves of *B. schreberi* (100 g) were extracted during 24h in a Soxhlet apparatus with 250 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The thimble was dried in vacuo (24 h), re-extracted with 250 ml MeOH (24 h), dried again in vacuo (24 h) and re-extracted with 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (24 h). The organic extracts were evaporated to yield 2.8 g (3 %) from  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and 15.3 g from

MeOH (15 %). The water extract was freeze-dried to give 4.5 g (5 %). The MeOH extract (14 g) was suspended in H<sub>2</sub>O (300 ml) and partitioned 3 times with 150 ml of water saturated with *n*-BuOH. The yield was 5.9 g (42 %) after solvent removal. The *n*-BuOH fraction was subjected to column chromatography using silica gel (200 g, 2.5 x 90 cm), and eluted with CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (26:14:3) to give eight fractions. Fraction 4 (225 mg), containing a major compound, was re-subjected to silica gel column chromatography using mixtures of CHCl<sub>3</sub>/MeOH of increasing polarities as eluents. A mixture of 156 mg of compounds with *R*<sub>f</sub>s of 0.5-0.8 was obtained. The major product (orange on TLC after NP-PEG treatment) was purified by preparative HPLC using the mobile phase H<sub>2</sub>O-MeOH (70:30) to give pure quercetin-7-*O*-β-glucopyranoside **1**. The water extract (4.3 g) was dissolved in 300 ml H<sub>2</sub>O and was extracted 8 times with 100 ml EtOAc. The fractions were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to yield 1.2 g (29 %) of a brown residue, which was subjected to silica gel column chromatography (100 g, 4.5 x 15 cm) and eluted with the solvent gradient CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (40:10:1 - 10:10:1) to give seven fractions. Fraction 2 (461 mg) was used directly for preparative HPLC separation to purify the major compound (violet on TLC after treatment) from the mixture (*R*<sub>f</sub>: 0.5-0.9). Elution with H<sub>2</sub>O for 10 min gave pure gallic acid **2**.

Quercetin-7-*O*-β-glucopyranoside (**1**): Yellow powder. APCI-MS *m/z*: 463 [*M* – H]<sup>–</sup> and 301 [*M* – H – glucose]<sup>–</sup>; HR ESI-MS (positive) *m/z*: 487.0844 (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>Na, 487.0852); UV λ<sub>max</sub> MeOH nm: 256, 370; IR (KBr) ν<sub>max</sub> cm<sup>–1</sup>: 3300, 2925, 1655, 1617, 1593, 1552, 1502, 1419, 1315, 1252, 1194, 1172, 1076, 932, 882, 797, 702,

625;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 293 K);  $\delta$  7.72 (1H, *d*,  $J$  = 1.8 Hz, H-2'), 7.57 (1H, *d*,  $J$  = 8.2 Hz, H-6'), 6.89 (1H, *d*,  $J$  = 8.2 Hz, H-5'), 6.77 (1H, *d*,  $J$  = 1.8 Hz, H-8), 6.41 (1H, *d*,  $J$  = 1.8 Hz, H-6), 5.08 (1H, *d*,  $J$  = 7.6 Hz, H-1''), 3.75-3.20 (unresolved m, other sugar protons);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 293 K);  $\delta$  176.5 (C-4), 163.7 (C-7), 160.8 (C-5), 156.2 (C-9), 148.5 (C-4'), 148.1 (C-2), 145.6 (C-3'), 136.5 (C-3), 122.1 (C-1'), 120.5 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.8 (C-2'), 105.1 (C-10), 100.3 (C-1''), 99.2 (C-6), 94.7 (C-8), 77.6 (C-5''), 76.8 (C-3''), 73.6 (C-2''), 70.0 (C-4''), 60.7 (C-6'').

Gallic acid (**2**): White powder. APCI-MS  $m/z$ : 169  $[\text{M} - \text{H}]^-$  and 125  $[\text{M} - \text{COOH}]^-$ ; HR ESI-MS (positive)  $m/z$ : 214.9935 (calcd for  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5 - \text{H} + 2\text{Na}$ , 214.9932); UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm: 220, 272; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3496, 3373, 1694, 1615, 1541, 1426, 1388, 1326, 1265, 1197, 1096, 1027, 958, 869, 767, 723, 560, 475;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 293 K);  $\delta$  7.06 (2H, *s*);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 293 K);  $\delta$  170.5 (C-7), 144.5 (C-3,5), 138.0 (C-4), 121.2 (C-1), 110.1 (C-2,6).

### 2.3.5 ORAC<sub>FL</sub> assay

The procedure was performed as described by Ou [8], with some modifications. 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 the addition of AAPH. The

final results were calculated using the differences between the areas under the fluorescein decay curves of the blank and the sample. ORAC values were expressed as micromole of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu\text{mol TE/mg}$ ).

### **2.3.6 Cell culture**

The human fibroblast WS-1 (#CRL-1502), the murine fibrosarcoma L-929 (#CCL-1) and the murine macrophage RAW 264.7 (# TIB-71) cell lines were all obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The WS-1 and L-929 cell lines were grown in Minimum Essential Medium containing Earle's salts (Mediatech Cellgro®, Herndon, USA), while the RAW 264.7 cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Mediatech Cellgro®). Both mediums (or media) were supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), 1 X solution of vitamins (Mediatech Cellgro®), 1 X sodium pyruvate (Mediatech Cellgro®), 1 X non-essential amino acids (Mediatech Cellgro®), 100 IU of penicillin and 100  $\mu\text{g/ml}$  of streptomycin (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ .

### **2.3.7 Antioxidant cell assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)**

Antioxidant activity was evaluated using DCFH-DA assay as described by Legault [9] with some modifications. L-929 cells were plated in 96-well microplates (BD Falcon) at 5000 cells per well and incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were washed with 150 µl HBSS (pH 7.4), incubated with 100 µl HBSS (pH 7.4) containing 5 µM DCFH-DA (Sigma-Aldrich) for 30 minutes and washed again with 150 µl HBSS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated with growing concentrations of *B. schreberi* methanol extract, trolox or quercetine, in the absence or presence of 200 µM tBH. The fluorescence was measured after 1 h and 4 h on the automated 96-well plate reader Fluoroskan Ascent FL™ (Labsystems), using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Student t-tests was used to determine statistical differences.

### **2.3.8 Cytotoxicity assay**

Exponentially growing cells were plated at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 96-well microplates (BD Falcon) in 100 µl of culture medium and were allowed to adhere for 16 hours before treatment. Then, the cells were incubated for 48 h in the presence or absence of 100 µl of increasing concentrations of quercetin or quercetin 7-*O*-β-glucopyranoside in DMSO (Sigma-Aldrich). The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid toxicity. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test as described by O'Brien *et al.* [10]. Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems) using

an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration of drug inhibiting cell growth by 50% (GI<sub>50</sub>).

### **2.3.9 Nitrite oxide measurement**

Exponentially growing cells were plated in 24-well microplates (BD Falcon) at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well in 400  $\mu$ l of culture medium and were allowed to adhere overnight. Cells were then treated or not with L-NAME (positive control), quercetin or quercetin 7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside dissolved in the appropriate solvents at 37 °C for 24h. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cells were then stimulated with LPS (100  $\mu$ g/ml) for 24h. Cell-free supernatants were collected and stored at -80 °C until NO determination using the Griess reaction [11] with minor modifications. Briefly, 100  $\mu$ l aliquots of cell supernatants were incubated with 50  $\mu$ l of 1% sulfanilamide and 50  $\mu$ l of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> at room temperature for 20 min. Absorbance at 540nm 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 NaNO<sub>2</sub> standard curve.

## 2.4 Results and Discussion

### 2.4.1 Evaluation of antioxidant activity of *B. schreberi* leaf extract and isolation of the main compounds

Three *B. schreberi* leaf extracts were obtained by sequential extraction respectively with dichloromethane, methanol, and water. The antioxidant potential of each extract was assessed using the ORAC assay. In Table 2.1, the results indicate that the dichloromethane extract is slightly active, with an ORAC value of  $0.8 \pm 0.4$   $\mu\text{mol TE/mg}$ , while the methanol and water extracts were strongly active, with ORAC values of  $7 \pm 2$  and  $5.1 \pm 0.5$   $\mu\text{mol TE/mg}$  respectively. As illustrated in Figure 2.1, isolation of the main compounds of the methanolic and water extracts was performed in order to identify the compounds responsible for their antioxidant activities. The methanolic extract was desugared with *n*-BuOH-saturated  $\text{H}_2\text{O}$ , the *n*-BuOH fraction was repeatedly chromatographed on silica gel columns and eight fractions were collected. Major compound **1** was found in fraction 4 and was isolated by HPLC for identification. The water extract was extracted with EtOAc and subjected to silica gel column chromatography. Seven fractions were collected and main compound **2** was found in fraction 2 and was isolated by HPLC for identification.



### 2.4.2 Identification of the main compounds from the leaves of *B. schreberi*

Compound **1** exhibited a peak at  $m/z = 487.0844$  in the HR ESI-MS analysis, corresponding to a molecular formula of  $C_{21}H_{20}O_{12}Na$ , which was supported by  $^{13}C$  NMR data (see materials and methods). The APCI-MS spectrum of **1** showed peaks at  $m/z$  301 (loss of 162), suggesting the presence of a hexose bonded to an aglycone moiety. After acid hydrolysis of compound **1**, quercetin and glucopyranose were tentatively identified by TLC comparison with standards. Configuration of the sugar moiety was determined to be  $\beta$ , based on the coupling constant of the anomeric proton ( $J_{1'',2''} = 7.6$  Hz). Also, the anomeric proton showed a correlation in the HMBC spectrum with  $\delta_C$  163.7 (C-7). Thus, based on these findings and all of the spectroscopic data (see Materials and Methods) the structure of compound **1** (Figure 2.2) was determined to be quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside, which was further confirmed by comparison with literature data [12]. Compound **2** exhibited a blue-violet colour on TLC using NP/PEG reagent, which is characteristic of phenolic compounds [7]. The molecular formula was deduced as being  $C_7H_6O_5$  from HR ESI-MS results (see materials and methods). Finally, comparison of APCI-MS and NMR data with the literature [13] confirmed that compound **2** was gallic acid (Figure 2.2). Compounds **1** and **2** were identified for the first time in *B. Schreberi* leaves. However, compound **1** was previously isolated from *Chrysanthemum segetum* [14], *Asclepias syriaca* [15], *Carthamus lanatus* [16] and *Carthamus tinctorius* [17] and compound **2** is a widespread phenolic compound.

### 2.4.3 Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of quercetin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside

The antioxidant activities of compounds **1** and **2** were evaluated using the *in vitro* ORAC assay. The results presented in Table 2.1 indicate that **1** and **2** are antioxidants, with ORAC values of  $18 \pm 4$  and  $4 \pm 1$   $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ , respectively. Compound **1** was found to be more active than quercetin, a strong antioxidant possessing an ORAC value of  $10 \pm 1$   $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ . These results suggest that **1** and **2** are, in part, responsible for the antioxidant activity of the methanolic and water extracts, respectively. The antioxidant activity of **2** was previously reported in the literature [18] but, to our knowledge, not the antioxidant activity of **1**. However, quercetin-3-O-glucoside was also found to be a strong antioxidant using the ORAC assay [19]. To support the results obtained *in vitro*, the antioxidant activity of **1** was also assessed using an *ex vivo* cell based-assay. The results presented in Figure 2.3 show that 0.25 and 1  $\mu\text{g/ml}$  of compound **1** inhibited the tBH-induced oxidation of DCFH by roughly 52% and 68% respectively. In comparison, Trolox (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ), a water-soluble vitamin E derivative, and quercetin (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ), inhibited the tBH-induced oxidation of DCFH by about 51% and 80%, respectively. However, whereas quercetin was found to be cytotoxic for L-929 cells, no such cytotoxicity was observed for compound **1** (data not shown). The cytotoxic activities of quercetin and compound **1** were also assessed towards normal human fibroblasts (WS-1). The cells were incubated for 48 hours in the presence or absence of growing concentrations (doses ranging from 1 to 36  $\mu\text{g/ml}$ ) of **1** or quercetin. In Figure 2.4, the results indicate that **1** was not

cytotoxic towards WS-1, with 95% cell survival at 36  $\mu\text{g/ml}$ . In contrast, quercetin was found to be cytotoxic in a dose-dependent manner, cell growth being inhibited by 50% at  $6.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ . Quercetin has previously been reported as being cytotoxic towards normal cultured human cells [20]. The cytotoxicity of quercetin could be due to an increase of intracellular reactive oxygen species. Indeed, quercetin may act as a prooxidant after the intracellular metabolic activation of quercetin to *o*-quinone [21]. Chronic quercetin administration in the rat also showed prooxidant effect [22].

#### **2.4.4 Evaluation of anti-inflammatory and cytotoxic activities of quercetin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside on murine RAW 264.7 macrophages**

A variety of *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that several flavonoids possess anti-inflammatory activities [23]. Moreover, flavonoids have been reported to possess beneficial effects on cardiovascular diseases and chronic inflammatory diseases associated with nitric oxide (NO) [24]. Jung and Sung showed that quercetin treatment of LPS-stimulated murine RAW 264.7 macrophages reduced nitrite release significantly, indicating that some dietary antioxidants possess significant anti-inflammatory activities [25]. However, cytotoxicity of quercetin towards RAW 264.7 cells was not investigated by these authors. In our study, the cytotoxic effects of quercetin and compound 1 were assessed on growing RAW 264.7 cells. The results, presented in Figure 2.5A, show that compound 1 was not found to be significantly cytotoxic towards RAW 264.7 cell lines at doses ranging from 1 to 16  $\mu\text{g/ml}$ . In contrast, quercetin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) was cytotoxic, with a

66% cell survival rate. The anti-inflammatory activity of **1** was evaluated on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages as described in materials and methods. N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO synthase inhibitor which prevents the overproduction of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [26], was used as a positive control. The results presented in Figure 2.5B show that compound **1** significantly inhibited overproduction of NO in a dose-dependent manner, with a  $40 \pm 2\%$  inhibition at 16  $\mu\text{g/ml}$ . In comparison, the positive control L-NAME prevented NO release by  $44 \pm 2\%$  at 62.5  $\mu\text{g/ml}$ . Altogether, these results indicate that **1** is not cytotoxic and possesses significant anti-inflammatory activity.

In summary, two phenolic compounds, quercetin 7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside (**1**) and gallic acid (**2**), were identified for the first time in *B. Schreberi* leaves. Both compounds were found to exhibit strong antioxidant activities. Compound **1** possesses an interesting anti-inflammatory activity and, unlike quercetin, it was not found to be cytotoxic.

## 2.5 Acknowledgments

We thank Dr. F-X. Garneau for his help and suggestions. The authors would like to thank Patrick Nadeau for plant identification. This work was supported by the Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi and by Action Concertée FQRNT - Fonds de la recherche forestière du Saguenay - Lac-Saint-Jean.

## 2.6 References

- <sup>1</sup> Brouillet L, Goulet I. Flore laurentienne, 3<sup>rd</sup> Edition. Montréal : Les Presses de l'Université de Montréal; 1995. p. 237-40.
- <sup>2</sup> Wiersema JH. Flora of North America. Oxford: Oxford University Press; 1997. p.78-80.
- <sup>3</sup> Misaki A, Smith F. Structure of the Polysaccharide of the Japanese Water Plant, *Brasenia schreberi* J.F. Gmel. J Agric Food Chem 1962; 10: 104-8.
- <sup>4</sup> Hartwell JL. Plants Used Against Cancer. Lawrence: Quaterman Publications, Inc.; 1982, 30-4.
- <sup>5</sup> Duke JA, Ayensu ES. Medicinal Plants of China. Algonac: Reference Publications, Inc. 1985.
- <sup>6</sup> Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research; 1986.
- <sup>7</sup> Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. New York: Springer Verlag; 1984.
- <sup>8</sup> Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. J Agric Food Chem. 2001; 49: 4619-26.
- <sup>9</sup> Legault J, Dahl W, Debiton E, Pichette A, Madelmont JC. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. Planta Medica. 2003; 69: 402-407.
- <sup>10</sup> O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 2000; 267: 5421-26.
- <sup>11</sup> Green, SJ, Meltzer, MS, Hibbs, JB Jr, Nacy, CA, 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. Journal of Immunology. 1990; 144 : 278-283.
- <sup>12</sup> Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ. Carbon-13 NMR studies of flavanoids-III: Naturally occurring flavanoid glycosides and their acylated derivatives. Tetrahedron 1978; 34 : 1389-1397.
- <sup>13</sup> Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. New York: Academic Press; 1982.
- <sup>14</sup> Stich K, Halbwirth H, Wurst F, Forkmann G. UDP-glucose: flavonol 7-O-glucosyltransferase activity in flower extracts of *Chrysanthemum segetum*. Z Naturforsch [C] 1997; 52:153-8.
- <sup>15</sup> Sikorska M, Matlawska I. Quercetin and its glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. Acta Pol Pharm 2000; 57: 321-4.
- <sup>16</sup> Taskova R, Mitova M, Mikhova B, Duddeck H. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. Z Naturforsch 2003; 58: 704-707.

- <sup>17</sup> Yaginuma S, Shiraishi T, Igarashi K. Developmental transition of the flavanoid contents in Safflower leaves during stress-loaded cultivation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 1691-8.
- <sup>18</sup> Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 255-60.
- <sup>19</sup> Chen Y, Wang M, Rosen RT, Ho C-T. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* thumb. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 2226-8.
- <sup>20</sup> Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 253-9.
- <sup>21</sup> Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 107-16.
- <sup>22</sup> Choi EJ, Chee KM, Lee BH. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 482: 281-5.
- <sup>23</sup> Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439: 175-82.
- <sup>24</sup> Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 850-7.
- <sup>25</sup> Jung WJ, Sung MK. Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264.7 macrophages. *Biofactors* 2004; 21: 113-7.
- <sup>26</sup> Paul A, Bryant C, Lawson MF, Chilvers ER, Plevin R. 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. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1439-44.

## 2.7 Table and figures

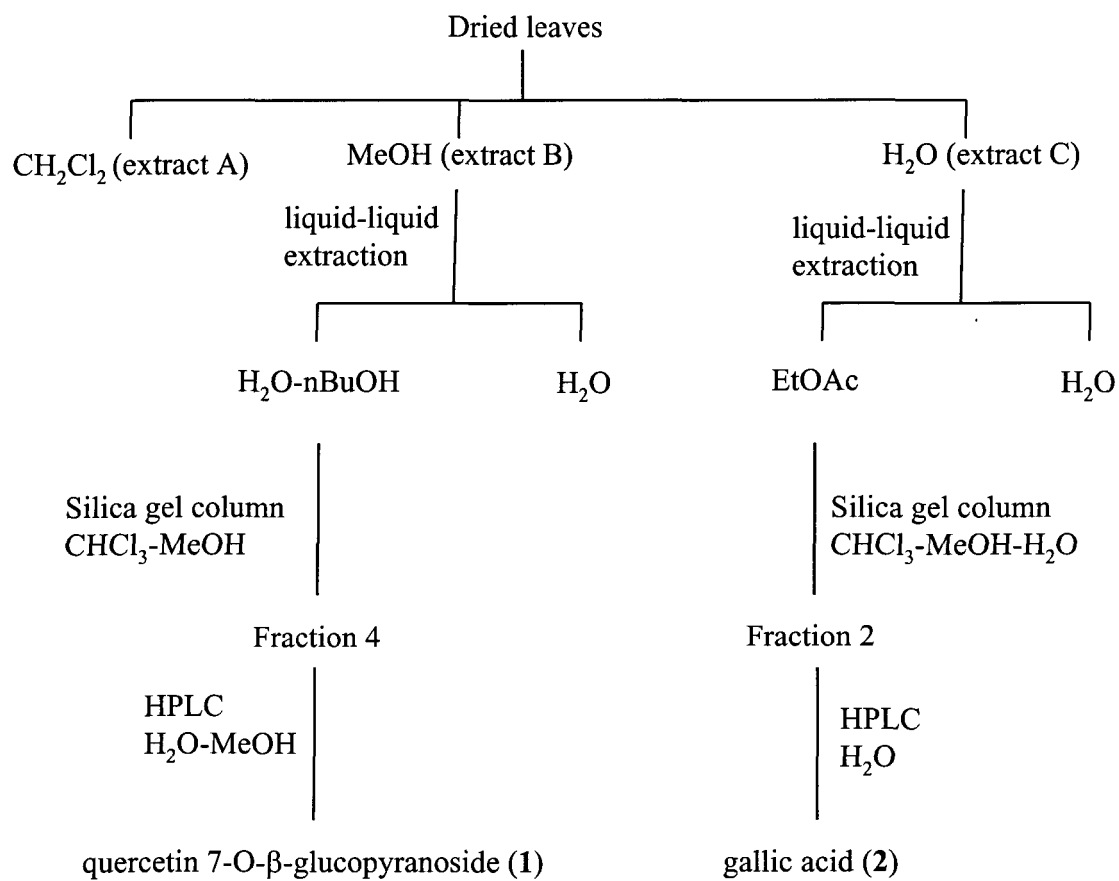


Figure 2.1. Schematic isolation of major compounds from *B. schreberi* leaf extracts

Table 2.1 Antioxidant activity of *B. schreberi* extracts and its constituents using ORAC<sub>FL</sub> assay

Extracts and compounds	ORAC <sub>FL</sub> value *
extract A	0.8 ± 0.4
extract B	7 ± 2
extract C	5.1 ± 0.5
Quercetin	10 ± 1
<b>1</b>	18 ± 4
<b>2</b>	4 ± 1

\* ORAC results for extracts are expressed as micromoles of Trolox equivalents per mg (μmol TE/mg). Quercetin, quercetin 7-*O*-β-glucopyranoside and gallic acid are expressed as micromoles of Trolox equivalents per micromoles (μmol TE/μmol).

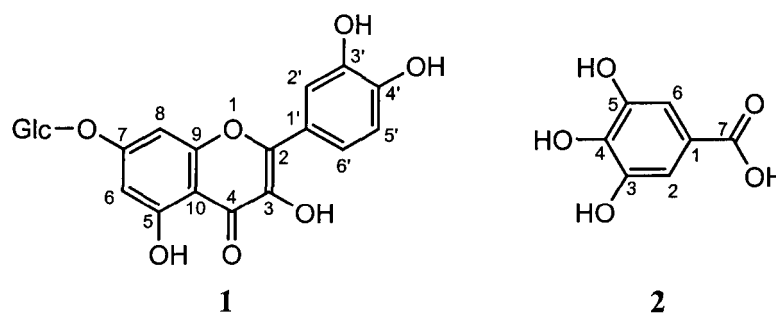


Figure 2.2. Molecular structures of antioxidant compounds isolated from *B. schreberi*



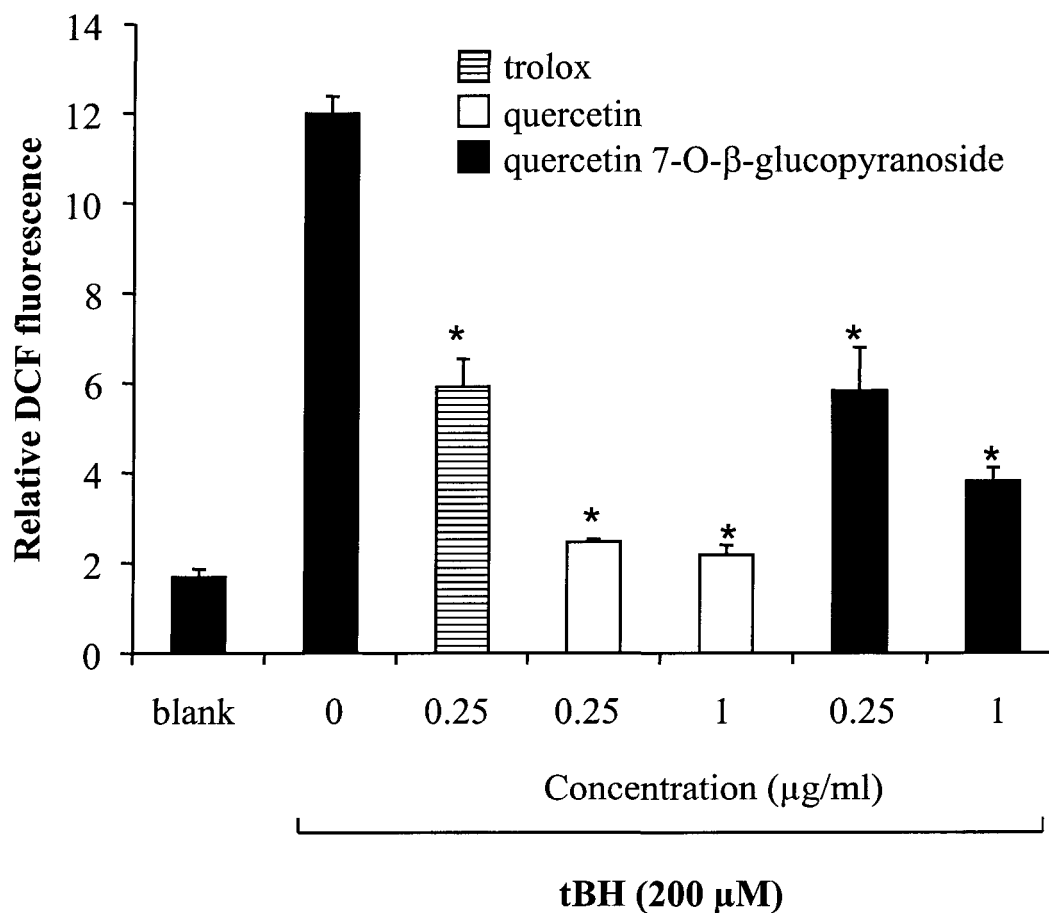


Figure 2.3. Effect of quercetin and quercetin 7-*O*-β-glucopyranoside on ROS production induced by tBH in L-929 cell lines. Trolox (0.25 μg/ml) was used as standard. Each value represents the mean ± S.D. of three determinations. (\*) Significantly different from cells treated with tBH 200 μM only;  $P \leq 0.05$ , Student t-test.

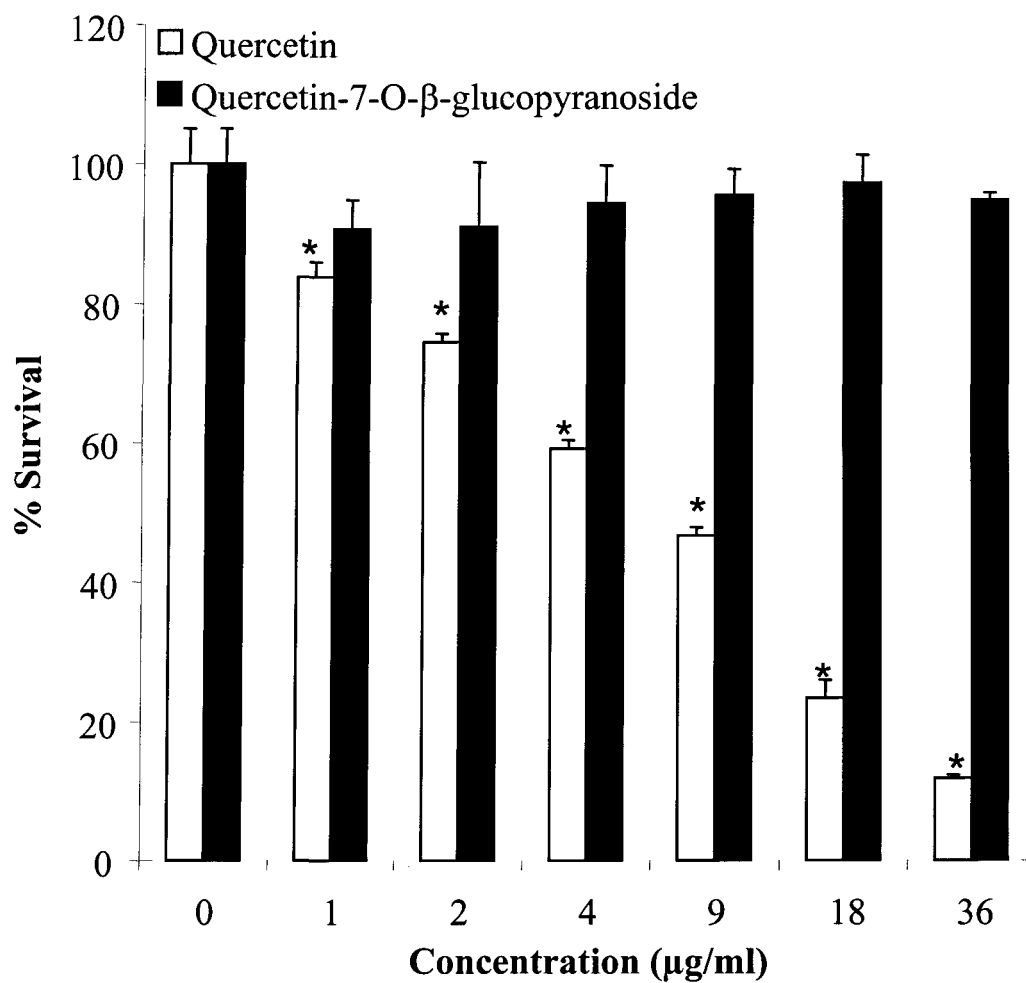


Figure 2.4. Cytotoxicity of quercetin and quercetin-7-*O*-β-glucopyranoside on human fibroblast cell line WS-1. Each value represents the mean ± S.D. of three determinations. (\*) Significantly different from control;  $P \leq 0.05$ , Student t-test.

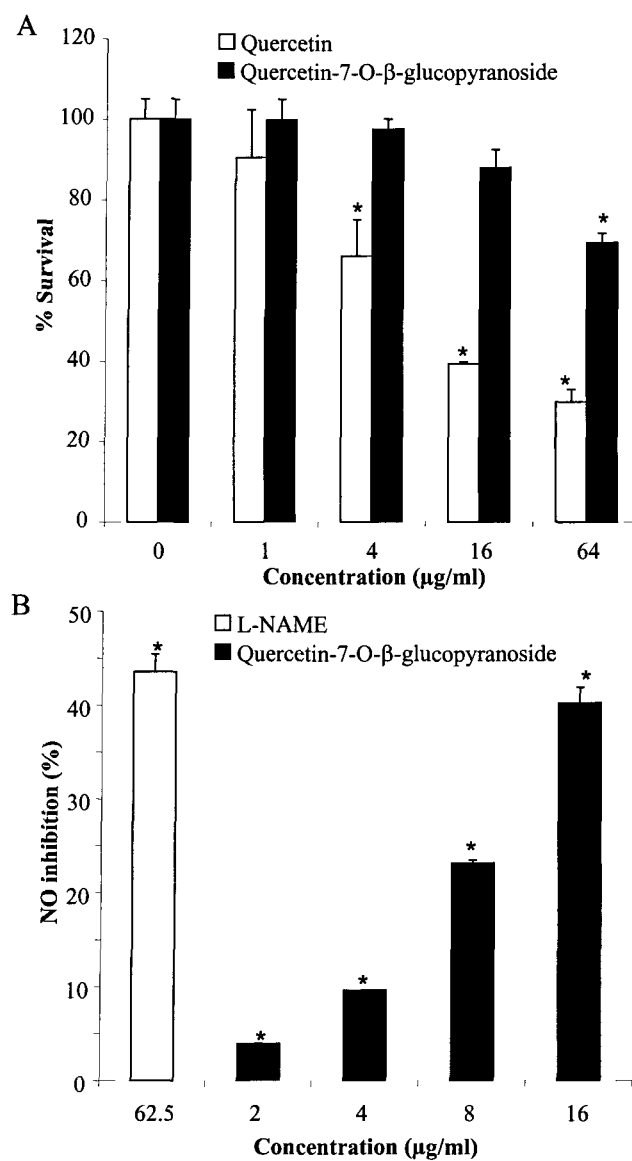


Figure 2.5. Effect of quercetin-7-*O*-β-glucopyranoside on (A) cytotoxicity and (B) NO production after stimulation of the murine macrophage cell line RAW 264.7 with LPS. L-NAME (62.5 μg/ml) was used as standard. Each value represents the mean ± S.D. of three determinations. (\*) Significantly different from control;  $P \leq 0.05$ , Student t-test.

### CHAPITRE III

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### **3.1 Échantillonnage**

La campagne d'échantillonnage fût planifiée au lac Simoncouche de la station de recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (Coordonnée GPS : N48,217629°-O71.250561°) dans la réserve faunique des Laurentides en août 2003. Les spécimens ont été recueillis à des profondeurs variant de 0,5 à 2 mètres de façon aléatoire simple, c'est-à-dire à des endroits choisis au hasard sur le plan d'eau. L'échantillonnage a été de type instantané, donc composé d'une seule prise et la durée de tous les prélèvements n'excédait pas une demi-journée. La méthode manuelle a été utilisée pour la cueillette des plantes, et celles-ci ont été conservées à l'ombre et au frais à l'aide de glacières jusqu'à leur arrivée au laboratoire.

### **3.2 Extraction et isolation**

Les feuilles séchées à l'air ont été extraites par solvants et les résultats détaillés sont décrits dans la publication (section 2.3.4). Un robot culinaire a été utilisé pour broyer la matière en fine poudre. L'extraction avec H<sub>2</sub>O a été effectuée en utilisant un format de cartouche de diamètre inférieur à celui de l'intérieur du Soxhlet. Cet ajustement était nécessaire puisque la polarité de 9,0 pour ce solvant réduit sa perméabilité dans les parois de cellulose, et par le fait même l'efficacité du montage.

Les manipulations décrites dans la publication (section 2.3.4) ont permis l'obtention de deux fractions (I et II). La fraction I a été purifiée deux fois sur colonne de silice et soumise à une chromatographie éclair sur gel de polyamide. L'isolation du composé **1** a été effectuée par HPLC phase inverse en utilisant une méthode isocratique H<sub>2</sub>O-MeOH (70:30). L'analyse par CCM phase inverse (C<sub>18</sub>) de la fraction II montre que le produit **2** est très polaire ( $R_f \sim 1$ ). Cette observation est à la base du développement d'une méthode de séparation en HPLC phase inverse avec 100 % H<sub>2</sub>O comme phase mobile. Les chromatogrammes HPLC des séparations préparatives sont disponibles en annexe 1.

### 3.3 Caractérisation

L'hydrolyse acide de **1** a permis d'obtenir et d'identifier la quercetine et le  $\beta$ -glucopyranose par comparaison avec des standards sur CCM ( $R_f$  et couleur). L'hydrolyse de **2** n'a démontré aucun changement, indiquant l'absence de section sucre sur la structure de base.

Les données APCI-MS présentées à la section 2.3.4 de la publication proviennent des spectres de masse en mode négatif (annexe 2). Le spectre de masse de **1** (MM 464,38) présente deux principaux signaux. Le signal de base représente l'ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$  de  $m/z$  463 tandis que le second en intensité correspond à la section aglycone  $[M - H - Glc]^-$  de  $m/z$  301 (figure 3.1). Le spectre de **2** (MM 170,12) présente un fragment de

base de  $m/z = 169$  pour l'ion pseudomoléculaire  $[M - H]^-$ . Le signal secondaire de  $m/z$  125 pourrait correspondre au départ de la fonction carboxylique de  $m/z$  44 (figure 3.2). Dans les deux cas, des groupements sont fragmentés des structures principales avant le bris des cycles aromatiques. Ces noyaux stabilisent les fragments et les ions pseudomoléculaires, augmentant ainsi la probabilité de leur apparition [1].

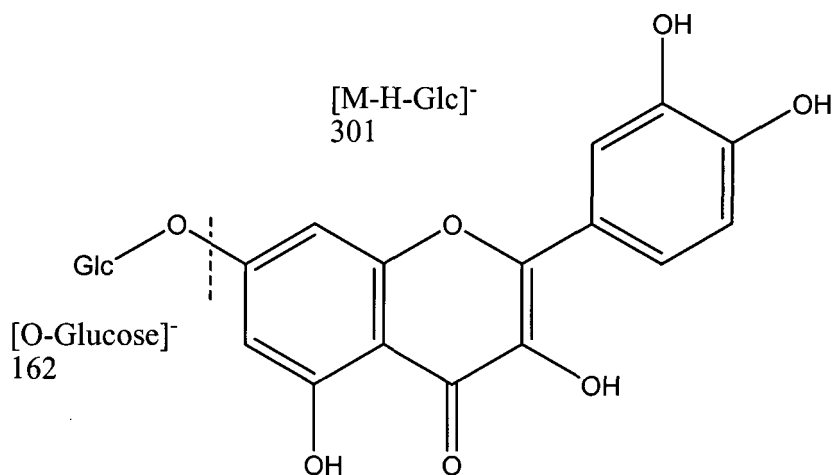


Figure 3.1. Fragmentation du lien glycosidique de 1

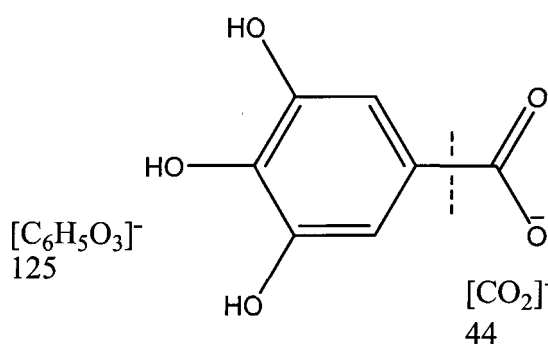


Figure 3.2. Fragmentation du lien polyphénol-acide de 2

Les spectres de masses exactes enregistrés en mode positif sont représentés en annexe 3, ainsi que les signaux utilisés à des fins de calibration. Pour le composé 1, le

fragment  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  487.0844 permet de calculer la masse exacte pour la formule  $[C_{21}H_{20}O_{12}Na]^+$ . Dans le cas du composé **2**, l'ion  $[M+H]^+$  est détecté, mais sa faible intensité suggère d'utiliser le fragment  $[M-H+2Na]^+$  de  $m/z$  214.9935 pour  $[C_7H_6O_5-H+2Na]^+$ . Les spectres UV enregistrés par le détecteur UV du HPLC analytique sont joints en annexe 4. Le spectre de **1** indique clairement la présence de un ou plusieurs cycles aromatiques avec un maximum d'absorbance à 256 nm, tandis que l'autre maximum à 370 nm est caractéristique aux molécules de la famille des flavonoïdes [2]. Pour la molécule **2**, il est possible de repérer l'absorption du cycle aromatique à 272 nm, celle à 220 nm étant fort probablement due au chromophore carboxyle [3].

Les résultats de l'analyse IR énumérés au chapitre II sont présentés sous forme de spectres en annexe 5. La forme large du signal unique à  $3299\text{ cm}^{-1}$  pour **1** a permis l'identification de la fonction alcool. De plus, la faible bande à  $1655\text{ cm}^{-1}$  peut être attribuée à une fonction alcène, voir aromatique, tel qu'analysé en UV précédemment. Le composé **2** est particulier pour sa bande d'absorption large à  $3373$ , comprenant plusieurs maxima. La présence de trois fonctions phénol et d'une fonction acide pourrait expliquer le fait que plusieurs modes vibrationnels et combinaisons de ceux-ci se superposent dans la zone de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Les signaux à  $1615\text{ cm}^{-1}$  et  $1694\text{ cm}^{-1}$  sont, quant à eux, attribuables aux vibrations aromatiques [1].

Les spectres RMN en annexe 6 sont reliés à l'analyse complète de **1** présentée dans la publication (section 2.3.4). Quelques signaux observés ne sont cependant pas



significatifs pour l'analyse. Par exemple, en RMN  $^1\text{H}$ , le singulet à 2,51 ppm correspond au solvant résiduel non-deuté (CD $_3$ ) $_2$ SO, tandis que celui à 3,17 est dû à la présence de H $_2$ O dans le solvant. Les signaux entre 6 et 8 ppm sont attribuables aux hydrogènes sur les cycles aromatiques, celui à 5,08 ppm correspond à l'hydrogène sur le carbone anomérique  $\beta$  du glucose et les plus blindés aux autres protons de la section sucre [4]. Vu le faible rapport signal/bruit du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (annexe 6), les expériences DEPT se sont avérées complémentaires pour l'assignation des 21 carbones. L'expérience COSY présente des corrélations entre certains protons de la section aglycone. Elle montre aussi une corrélation entre les signaux du proton anomérique et des protons de la section glucose. Le spectre HMQC a permis d'associer les protons avec leurs carbones respectifs. De plus, il a été utile pour confirmer la multiplicité de certains signaux en RMN  $^1\text{H}$ . Les diverses corrélations en HMBC ont été utilisées pour l'assignation des carbones quaternaires.

La structure du composé **2** a été confirmée par RMN (section 2.3.4) et les spectres sont présentés en annexe 7. La RMN  $^1\text{H}$  montre les deux protons équivalents à 7,06 ppm, le signal résiduel du solvant D $_2$ O à 4,79 ppm et du MeOH en trace à 3,29 ppm. Cinq signaux sont observés en RMN  $^{13}\text{C}$  pour les sept atomes carbones. Cette observation confirme la symétrie pour les carbones en ortho et en méta de la structure (figure 2.2). Les expériences DEPT confirment la présence d'un seul carbone tertiaire. Aucun signal de carbone primaire ou secondaire n'est observé, ainsi qu'aucune corrélation en COSY. Le spectre HMQC confirme la position des deux atomes d'hydrogène équivalents sur les carbones en ortho de la fonction acide carboxylique. Un spectre RMN  $^1\text{H}$  a été enregistré

dans  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , permettant d'observer le signal de protons hydroxyyles à 9,2 ppm, car l'échange de protons hydroxyyles est ralenti dans ce solvant aprotique.

### **3.4 Évaluation de l'activité biologique d'extraits de *Brasenia schreberi***

#### **3.4.1 Évaluation de la cytotoxicité des extraits**

La cytotoxicité des extraits bruts ( $\text{CHCl}_3$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ) a été évaluée sur deux lignées cancéreuses humaines, incluant un cancer du poumon (A-549) et un cancer du côlon (DLD-1), et une lignée de fibroblastes normaux. La méthode décrite par O'Brien et al. a été utilisée pour quantifier l'inhibition de la croissance cellulaire. Les résultats sont exprimés en concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire ( $\text{IC}_{50}$ ). Le tableau 3.1 montre que tous les extraits testés sont inactifs sur les deux lignées cancéreuses humaines. L'extrait aqueux est légèrement cytotoxique sur les fibroblastes humains WS-1 avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $54 \pm 9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Tableau 3.1  
Évaluation de l'activité anticancéreuse des extraits bruts

Extrait (solvant)	IC <sub>50</sub> (µg·mL <sup>-1</sup> )		
	A-549	DLD-1	WS-1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	> 113	> 113	> 113
MeOH	> 110	97 ± 4	84 ± 8
H <sub>2</sub> O	> 255	140 ± 30	54 ± 9

### 3.4.2 Activités antioxydante et anti-inflammatoire des composés isolés

Une recherche de la littérature concernant le quercetin 7-*O*-glucoside, connu aussi sous le nom trivial quercimeritrin (composé **1**), révèle diverses activités biologiques. Plusieurs études publiées présentent des propriétés antioxydantes [6], mais aucune ne rapporte une activité anti-inflammatoire, laquelle est souvent caractéristique aux flavonoïdes [7]. De plus, l'activité anti-inflammatoire de la quercetine, aglycone de **1**, a été évaluée et considérée comme relativement élevée [8]. Cette propriété a donc été évaluée en comparant la quercetine à son glucoside **1** (section 2.4.4). Les résultats démontrent que les deux homologues présentent des activités anti-inflammatoires similaires. Par contre, le glucoside s'avère relativement moins toxique sur cellules, donc plus intéressant au niveau pharmacologique. Le composé **1** présente donc des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire significatives, tout en étant relativement non toxique comparativement à la

quercetine. Selon la littérature, le glucoside en position 3 de la quercetine présente aussi des activités antioxydante et anti-inflammatoire [9].

Le composé **2**, l'acide gallique, est souvent retrouvé dans les végétaux, principalement sous forme de tanins hydrolysables. En règle générale, les tanins galliques sont des esters de l'acide gallique et du glucose, bien que le glucose et l'acide gallique existent aussi à l'état libre dans les végétaux. Plusieurs propriétés biologiques sont attribuées aux tanins : activités dues à l'astringence (affinité pour les protéines), activité antioxydante, inhibition enzymatique, toxicité, etc. [7]. Quant à l'acide gallique, une étude VCEAC (« vitamin C equivalent antioxidant capacity ») en relation avec la structure moléculaire a démontré que ce composé montrait la plus grande capacité antioxydante parmi le groupe de composés polyphénoliques testés [10]. L'acide gallique semble également utile dans la prévention de certains cancers [11]. Il est aussi utilisé comme antioxydant naturel pour la stabilisation de médicament comme le lovastatin [12]. Présent à 0,95 % dans une plante comme la *Anogeissus latifolia*, il est le composé majoritairement responsable du potentiel antioxydant de celle-ci [13]. Des effets synergiques ont par ailleurs été observés chez l'humain entre des acides phénoliques [14]. Un extrait aqueux d'*Ardisia compressa*, riche en acide gallique, était d'usage courant dans la médecine traditionnelle contre certaines maladies et cancers [15].

En résumé, l'acide gallique (**2**) isolé des feuilles de *B. schreberi* est un composé phénolique abondamment étudié pour ses nombreuses activités biologiques. Par ailleurs, il

est largement distribué dans la nature. Le quercetin 7-*O*-glucoside (**1**) présente une activité biologique connue, soit son potentiel antioxydant. Cette recherche démontre que ses activités antioxydante et anti-inflammatoire sont comparables à celles de son homologue, la quercetine. Cependant, le glucoside **1** est significativement moins toxique que son aglycone.

### 3.5 Références

- <sup>1</sup> Silverstein, R.M., Morrill, T.C., Bassler, C., Webster, F.X. (Eds), 1997. Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, New-York, 482 pp.
- <sup>2</sup> Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis. Springer Verlag, New York.
- <sup>3</sup> Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, 5<sup>th</sup> ed. Harcourt Brace & Company, Montréal, p. 333.
- <sup>4</sup> Agrawal, P.K., 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330.
- <sup>5</sup> 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. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-6.
- <sup>6</sup> Lee, J.Y., Chang, E.J., Kim, H.J., Park, J.H., Choi, S.W., 2002. Antioxydative flavonoids from leaves of *Carthamus*. *Arch. Pharm. Res.* 25 (3), 313-9.
- <sup>7</sup> Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, 3<sup>e</sup> éd. Éditions Tec & Doc., Paris, 1120 pp.
- <sup>8</sup> Delgado, G., del Socorro Olivares, M., Chavez, M.I., Ramirez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., Espinosa-Garcia, F.J., 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64 (7), 861-4.
- <sup>9</sup> Correia H, Gonzalez-Paramas A, Amaral MT, Santos-Buelga C, Batista MT, 2005. Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. *Biomed Chromatogr* Jun 24; [Epub ahead of print].
- <sup>10</sup> Kim, D.O., Lee, C.Y., 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (4), 253-73.
- <sup>11</sup> Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat. Res.* 554 (1-2), 53-65.

- <sup>12</sup> Orkoulas, M.G., Kontoyannis, C.G., Markopoulou, C.K., Koundourellis, J.E., 2004. Development of methodologies based on HPLC and Raman spectroscopy for monitoring the stability of lovastatin in solid state in the presence of gallic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (5), 1011-6.
- <sup>13</sup> Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao CV, Shirwaikar A, Rawat AK, Mehrotra S, Pushpangadan P, 2004. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. *Biol Pharm Bull.* 27(8), 1266-9.
- <sup>14</sup> Yeh, C.T., Shih, P.H., Yen, G.C., 2004. Synergistic effect of antioxidant phenolic acids on human phenolsulfotransferase activity. *J. Agric. Food Chem.* 52 (13), 4139-43.
- <sup>15</sup> Chandra, S., De Mejia Gonzalez, E., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52 (11), 3583-9.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce mémoire présente une étude des composés majoritaires retrouvés dans les feuilles de *Brasenia schreberi*, en partie responsables du potentiel antioxydant des extraits méthanolique et aqueux. L'activité biologique des composés isolés a été étudiée pour mettre en valeur le potentiel biopharmaceutique de la plante.

Les produits naturels ont été extraits par Soxhlet selon une approche séquentielle d'extraction en utilisant des solvants de polarité croissante (rendement total supérieur à 20 %). L'analyse par CCM des extraits a démontré que les produits naturels ont été séparés grossièrement en fonction de leur polarité. Les sucres et impuretés polaires présents dans les extraits méthanolique et aqueux ont été retirés au moyen d'extractions liquide-liquide. Les composés **1** et **2** ont été isolés par HPLC, provenant respectivement des extraits méthanolique et aqueux. Les structures ont été déterminées par les techniques spectroscopiques usuelles.

Le quercetin 7-*O*-glucoside (**1**) a démontré des activités antioxydante et anti-inflammatoire à un niveau comparable à son homologue non glucosidé. L'acide gallique (**2**) est un composé relativement connu pour ses diverses activités biologiques, dont son activité antioxydante.

Une étude plus approfondie du quercetin 7-*O*-glucoside (**1**) a permis de le caractériser comme agent antioxydant et anti-inflammatoire ayant une toxicité inférieure à



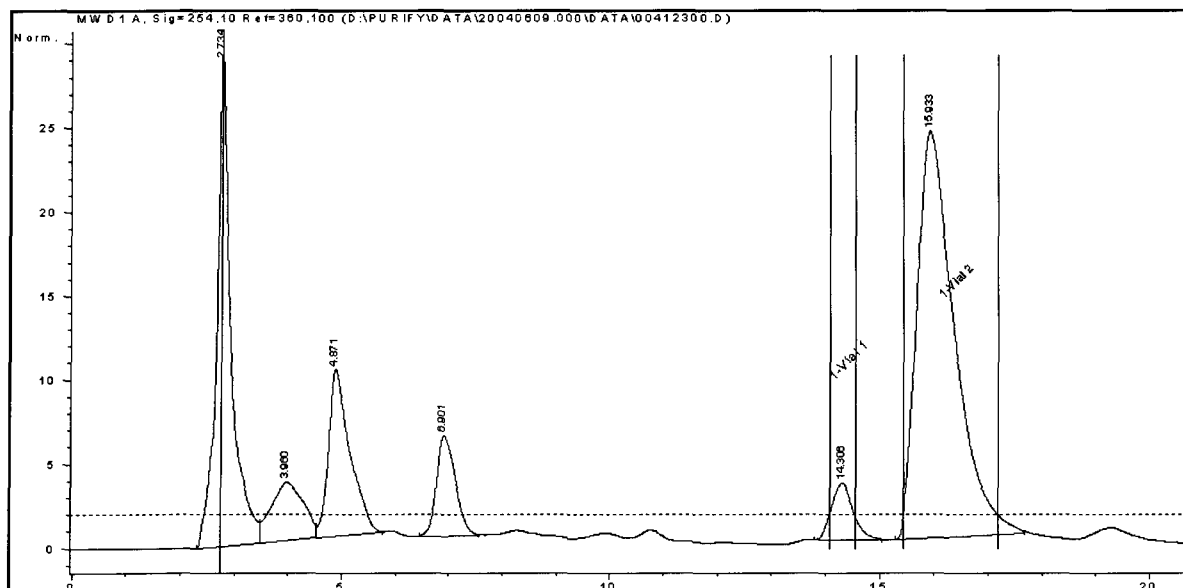
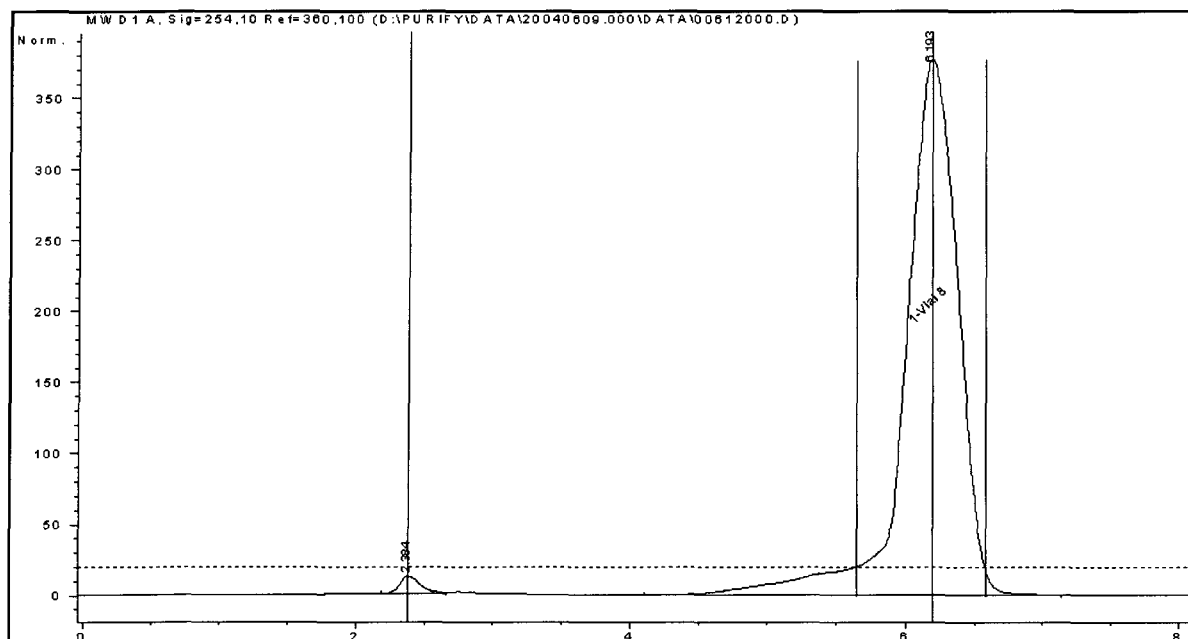
son homologue non glucosidé. Cette observation s'avère intéressante, car la quercétine est largement consommée dans le monde pour les nombreuses vertus qu'on lui attribue.

La présente étude a donc permis d'évaluer le potentiel bioactif de la *Brasenia schreberi*, et ce en rapport avec les activités anticancéreuse, antioxydante et anti-inflammatoire. De plus, les résultats de cette recherche justifient qu'il serait intéressant d'étudier le mécanisme d'action responsable de l'activité anti-inflammatoire du quercimeritrin.

## ANNEXES

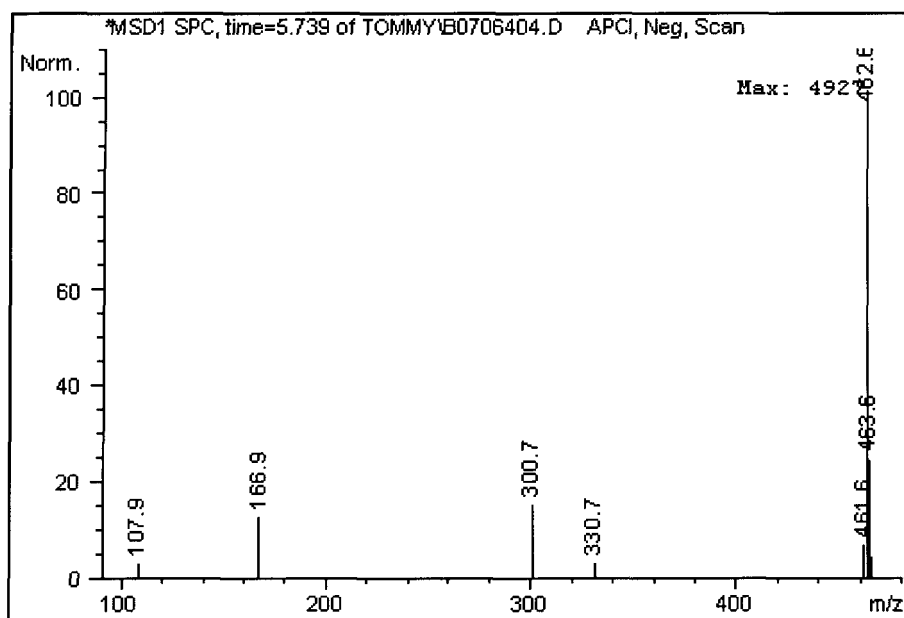
## ANNEXE 1

## Chromatogrammes des séparations par HPLC préparatif

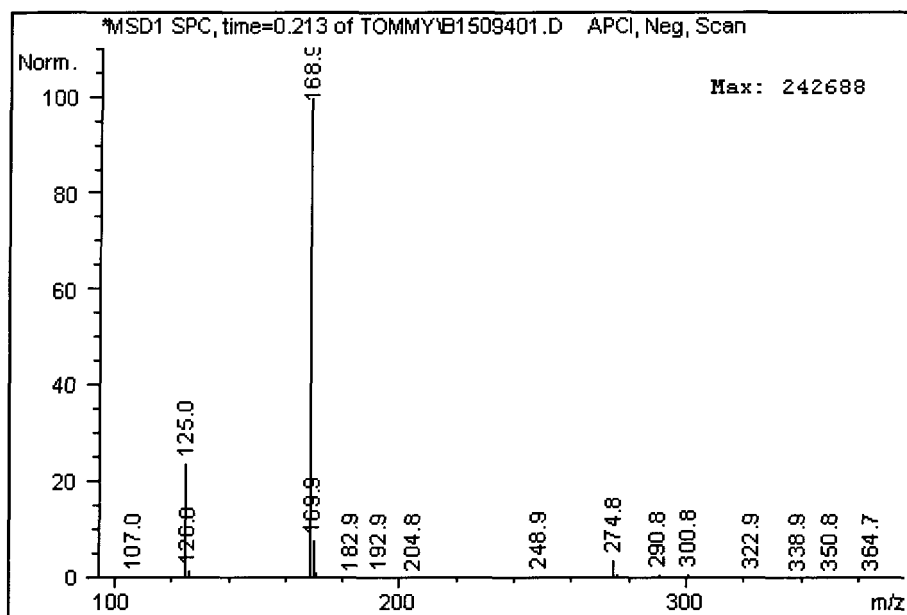
Chromatogramme HPLC prep. de l'isolation de 1 (15,9 min.); H<sub>2</sub>O-MeOH (70:30)Chromatogramme HPLC prep. de l'isolation de 2 (6,2 min.); H<sub>2</sub>O 100 %

## ANNEXE 2

## Spectres de masse APCI (mode négatif)



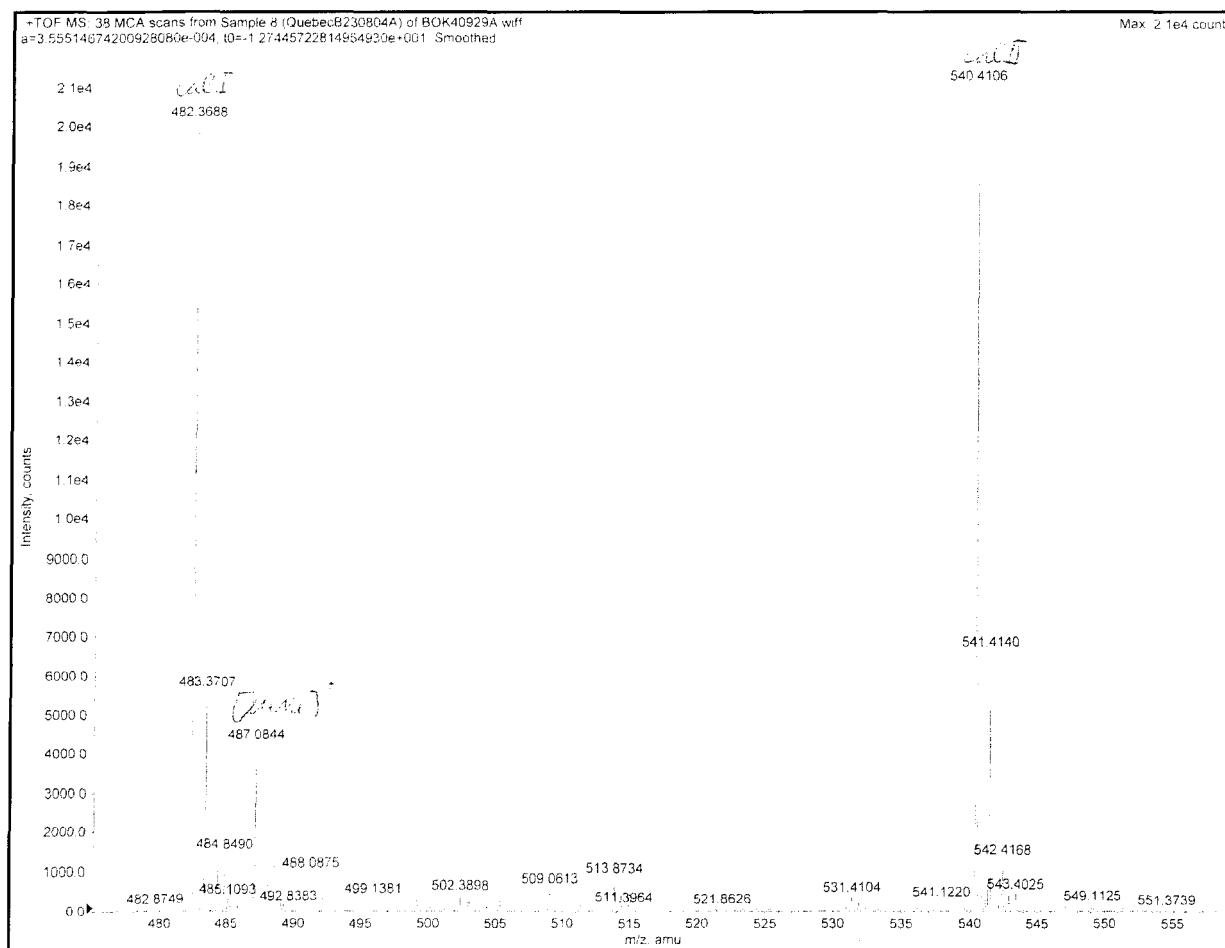
Spectre de masse de 1



Spectre de masse de 2

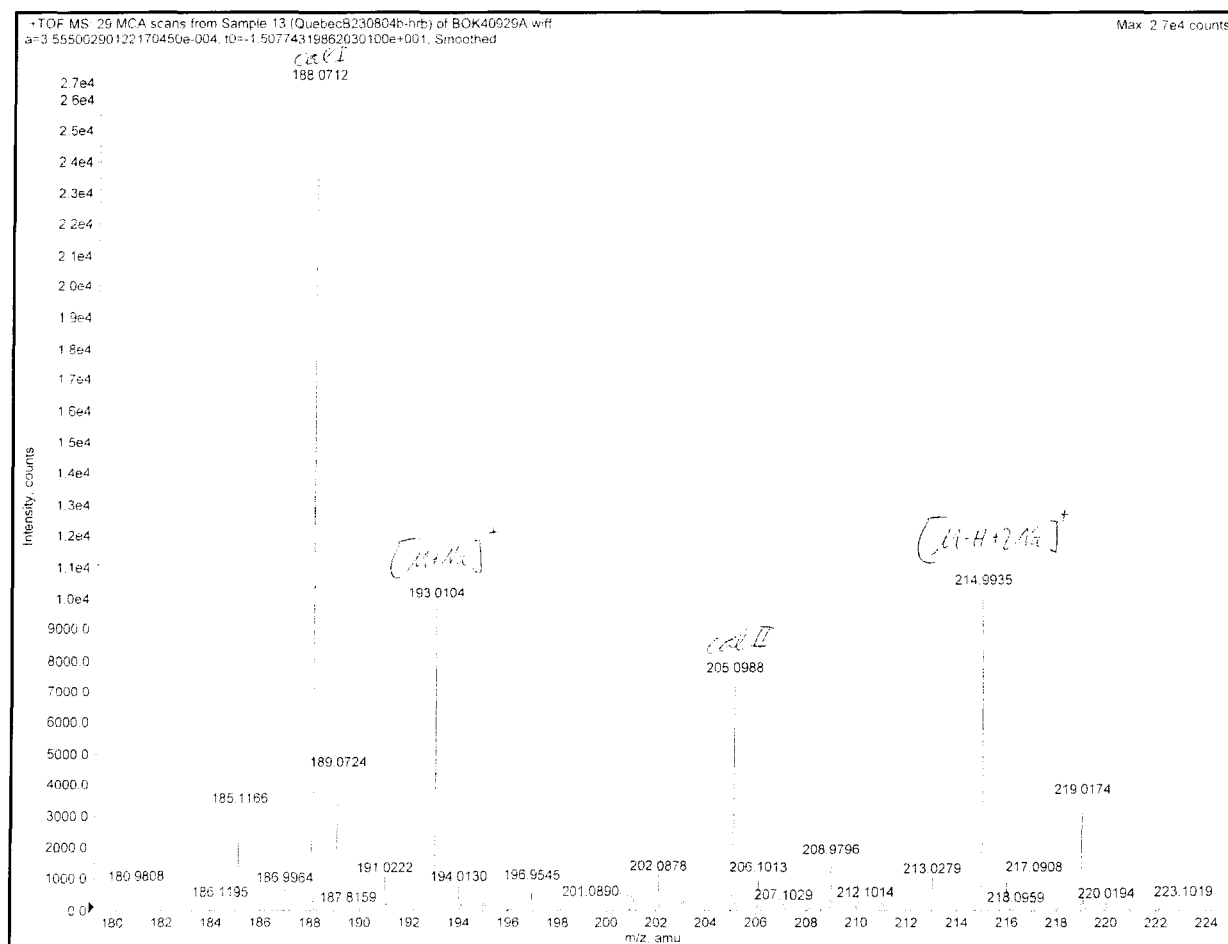
### ANNEXE 3

#### Spectres de masse HR ESI (mode positif)

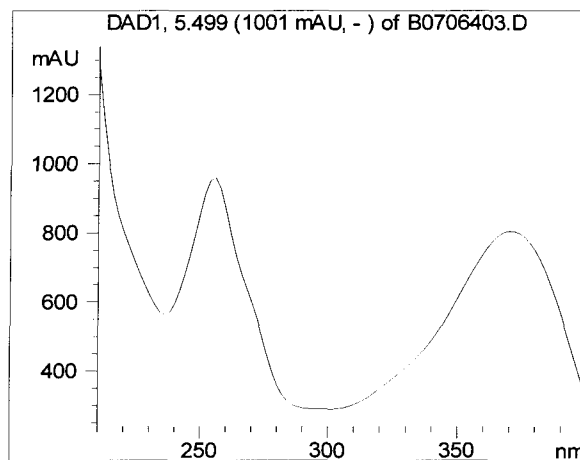
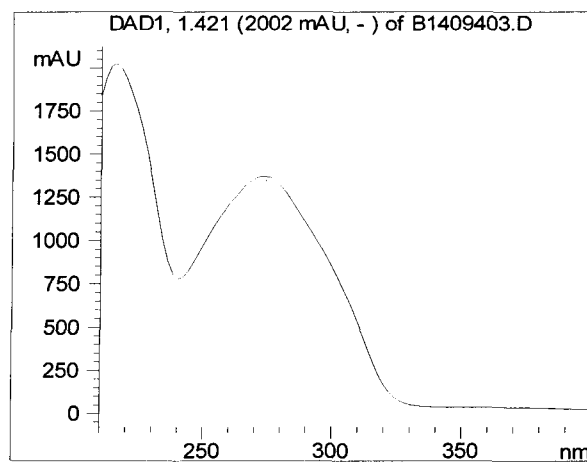


Spectre de masse exacte de 1

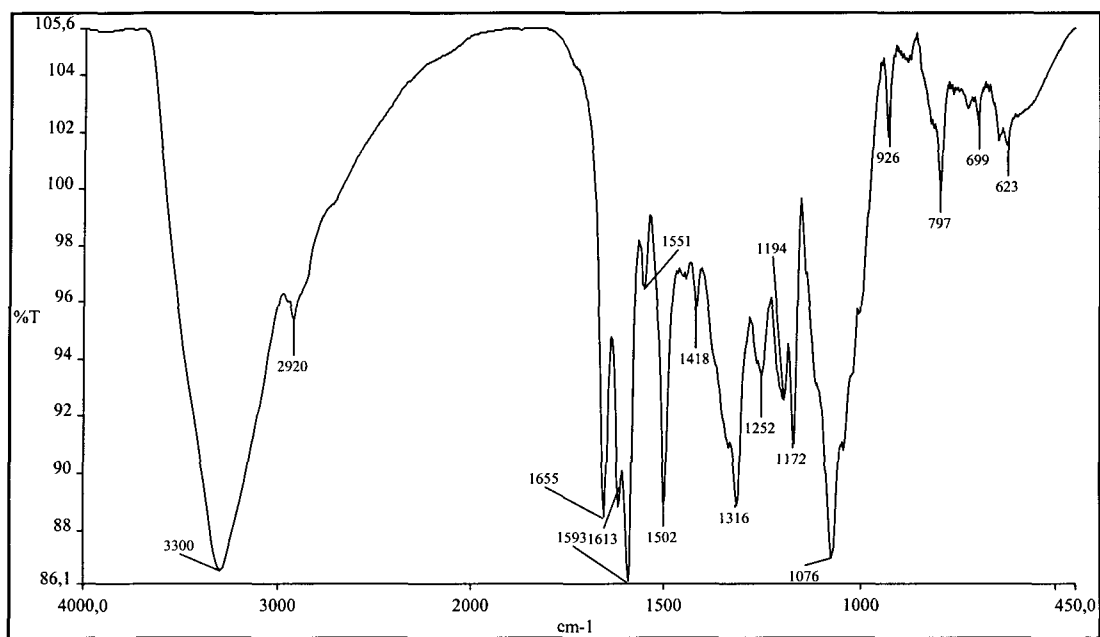
**ANNEXE 3 (suite)**  
**Spectres de masse HR ESI (mode positif)**



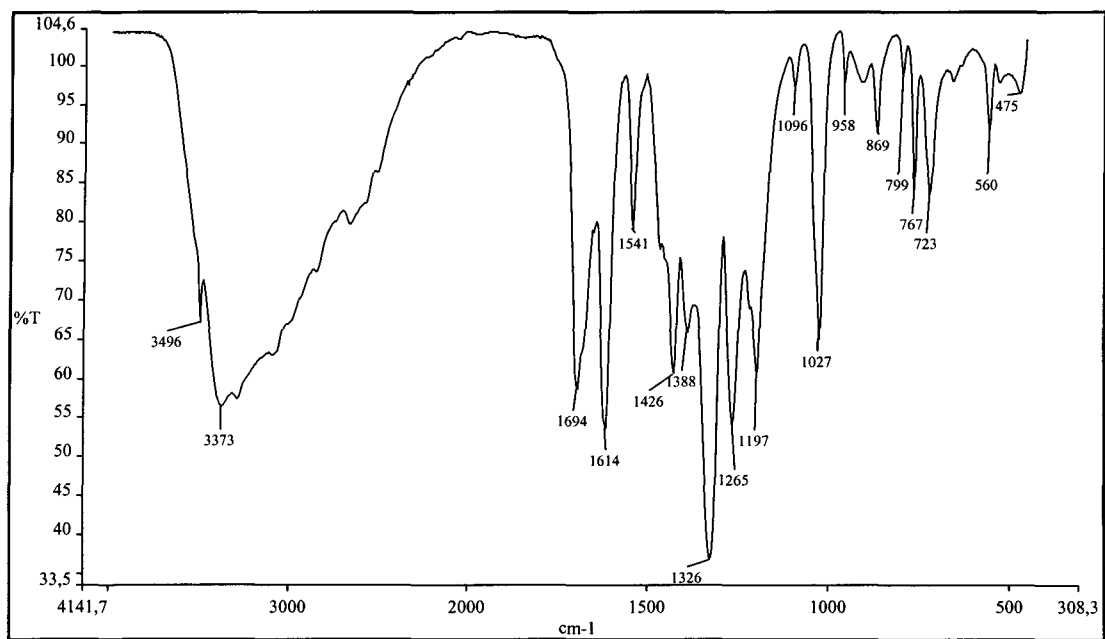
**Spectre de masse exacte de 2**

**ANNEXE 4****Spectres UV de 210 à 400 nm****Spectre UV de 1****Spectre UV de 2**

**ANNEXE 5**  
**Spectres IR de 4000 à 450  $\text{cm}^{-1}$**



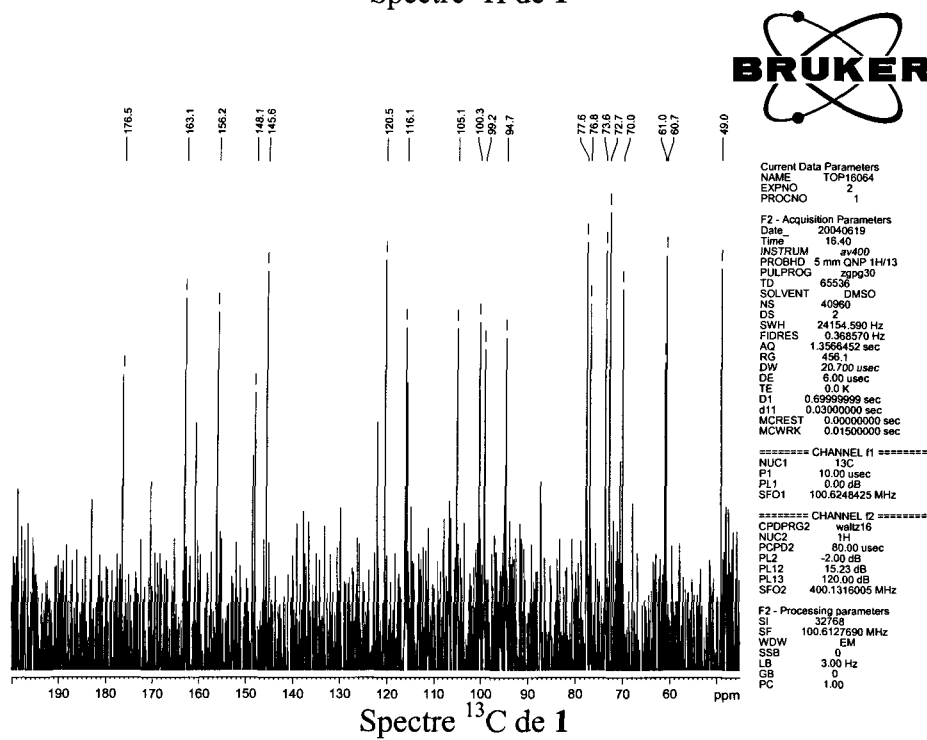
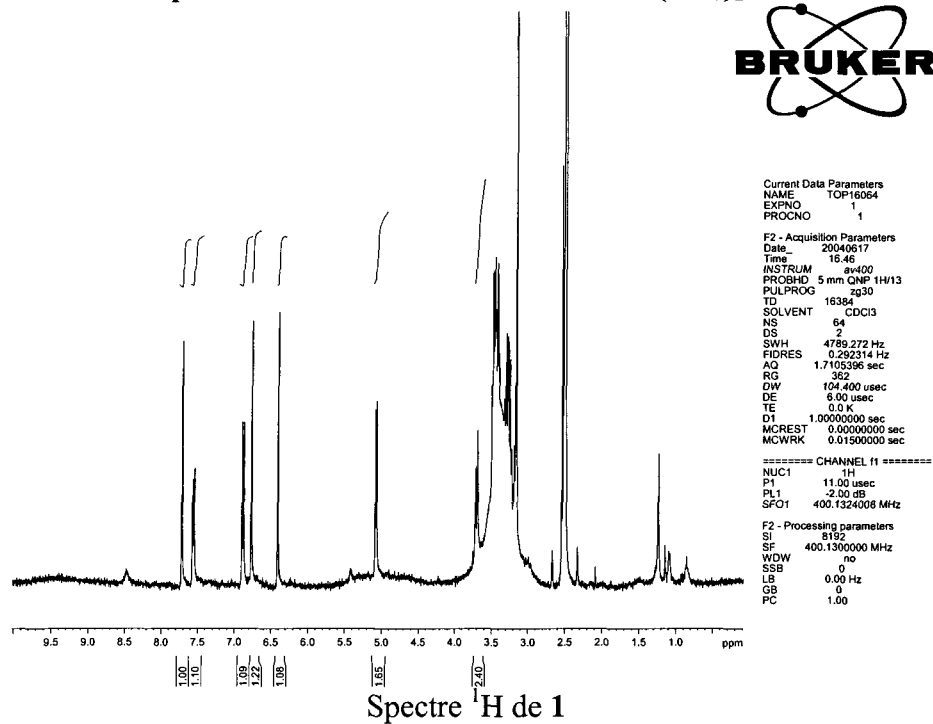
Spectre IR de 1

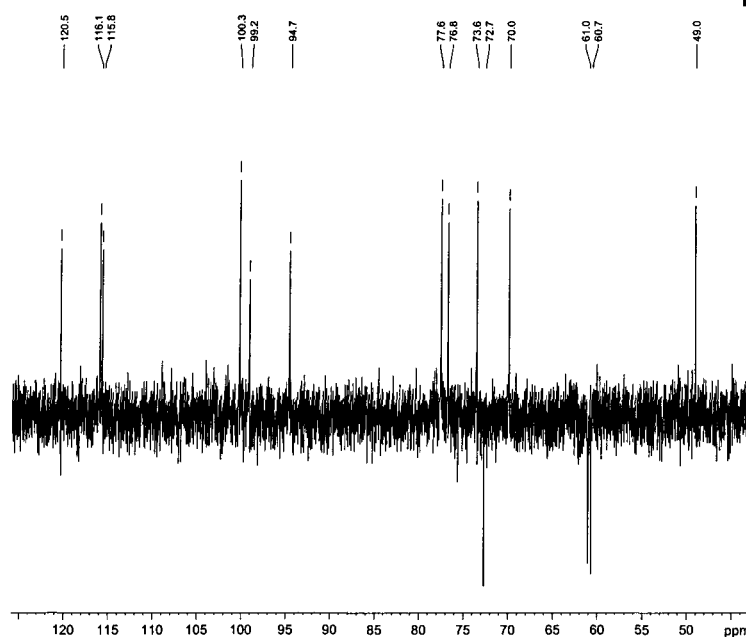


Spectre IR de 2

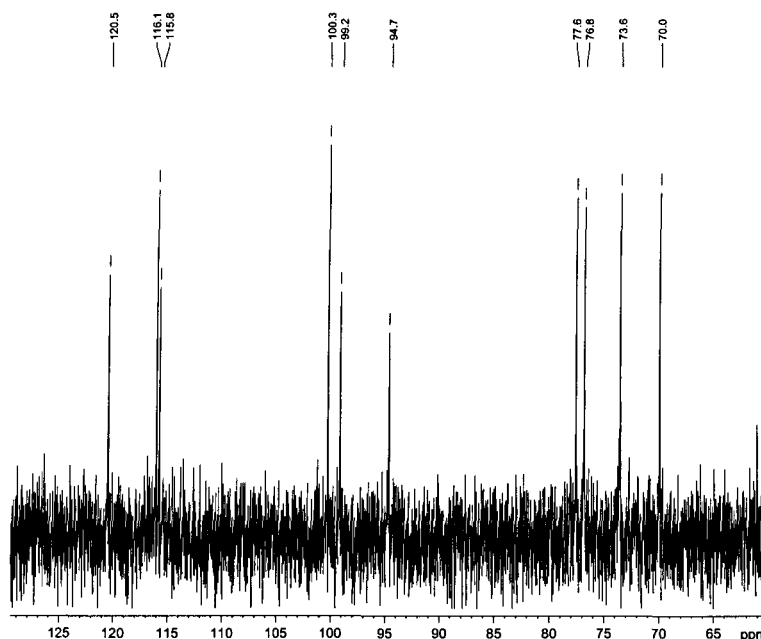


## ANNEXE 6

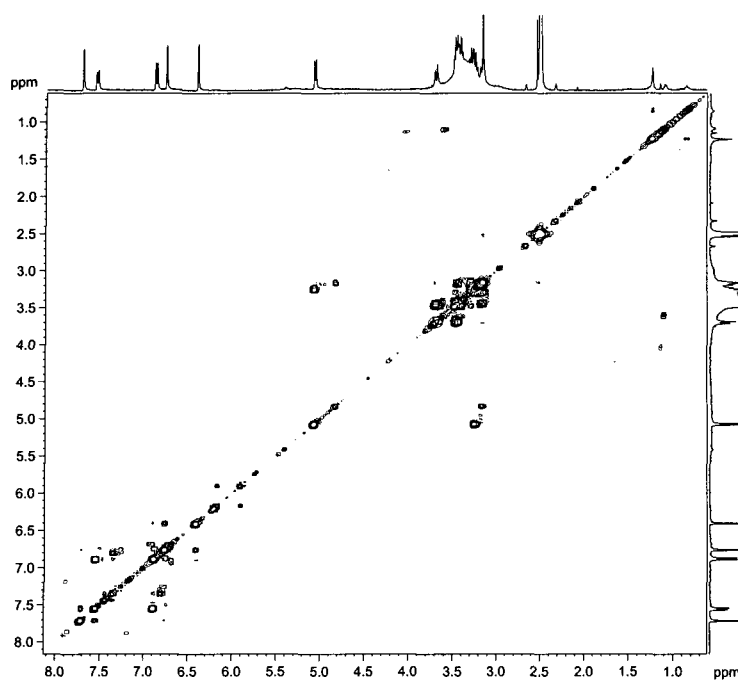
Spectres RMN de la molécule 1 dans  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 



Spectre DEPT 135 de 1



Spectre DEPT 90 de 1



Spectre COSY de 1

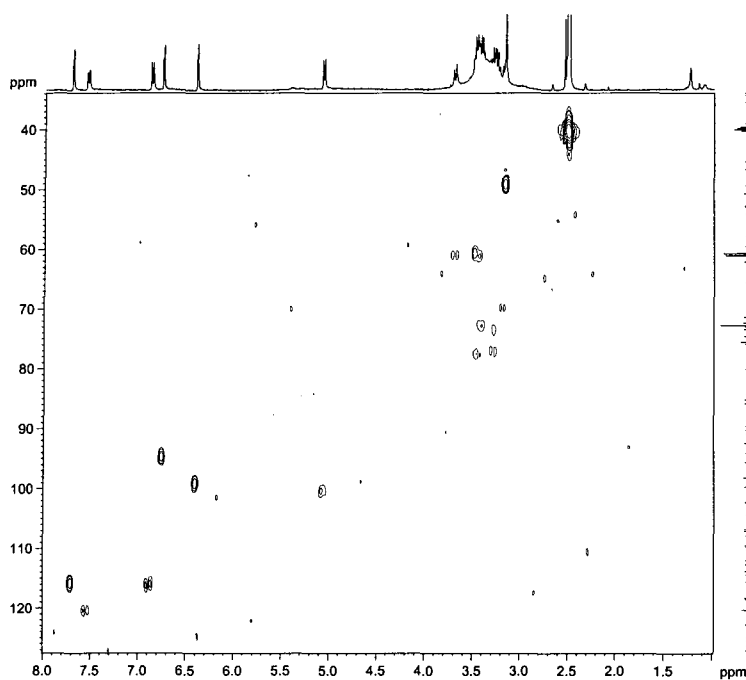
Current Data Parameters  
NAME TOP16064  
EXPNO 5  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20040620  
Time 15.54  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG cosygpgf  
TD 2048  
SOLVENT DMSO  
NS 16  
DS 16  
SWH 4789.272 Hz  
FIDRES 2.338512 Hz  
AQ 0.2138612 sec  
RG 2580.3  
DW 104.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
d0 0.00000300 sec  
D1 1.48689198 sec  
d13 0.0000400 sec  
D16 0.00020000 sec  
IN0 0.00020800 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRK 1.48689198 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P0 11.00 usec  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====  
GPNAM1 SINE 100  
GPNAM2 SINE 100  
GPX1 0.00 %  
GPY2 0.00 %  
GPY1 0.00 %  
GPY2 0.00 %  
GPZ1 10.00 %  
GPZ2 10.00 %  
P15 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters  
ND0 1  
TD 258



Spectre HMQC de 1

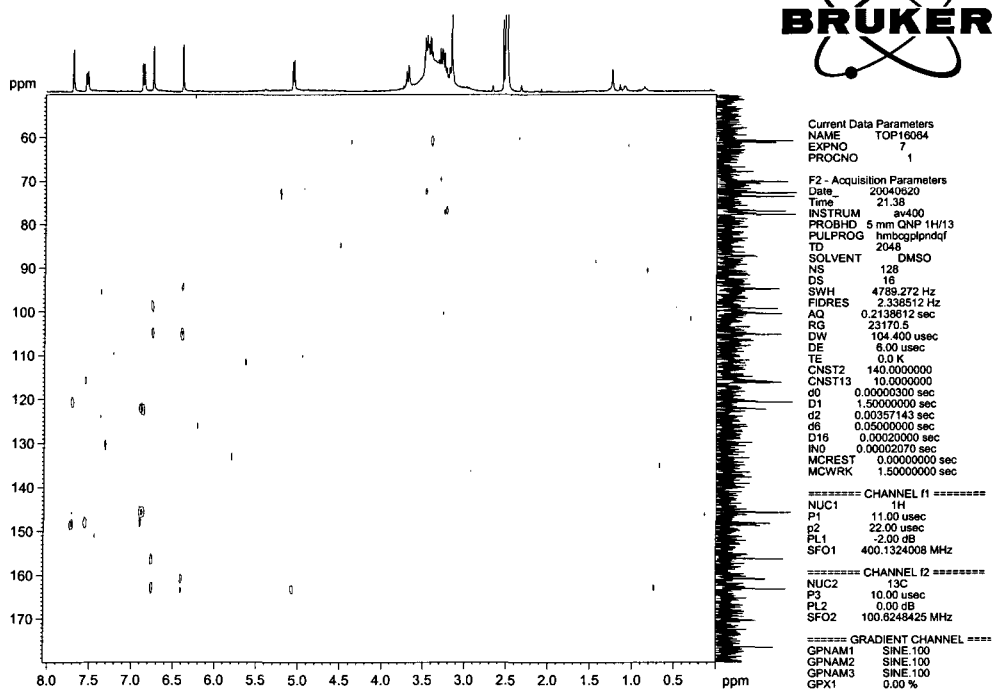
Current Data Parameters  
NAME TOP16064  
EXPNO 6  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20040620  
Time 17.54  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG hmqcpgf  
TD 1024  
SOLVENT CDCl3  
NS 64  
DS 16  
SWH 4789.272 Hz  
FIDRES 4.677023 Hz  
AQ 0.1069556 sec  
RG 26008  
DW 104.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
CNST2 145.000000  
d0 0.00000300 sec  
D1 1.50000000 sec  
d2 0.00344828 sec  
d12 0.00002000 sec  
d13 0.00004000 sec  
D16 0.00020000 sec  
DELTA1 0.00222428 sec  
IN0 0.00003106 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRK 1.50000000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
P2 22.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
CPDPRG2 gcp  
NUC2 13C  
P3 10.00 usec  
PCPD2 70.00 usec  
PL2 0.00 dB  
PL12 16.90 dB  
SFO2 100.6208180 MHz

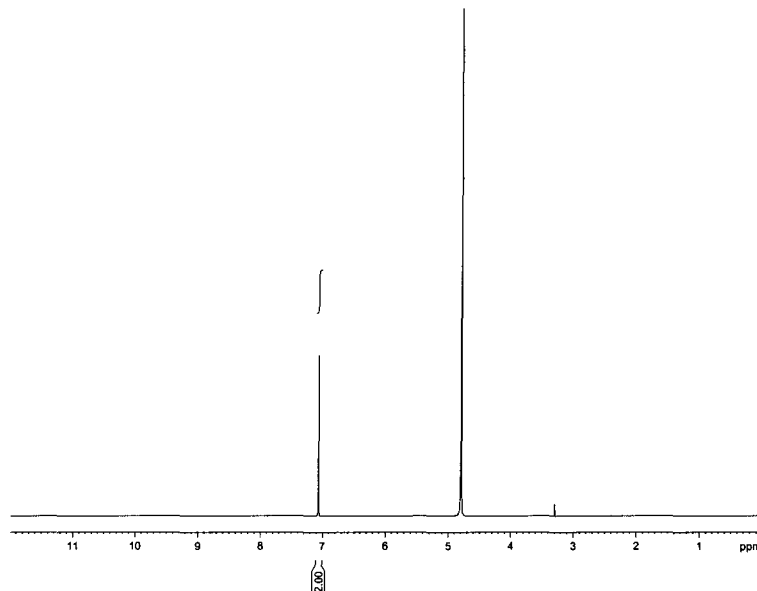
===== GRADIENT CHANNEL =====



Spectre HMBC de 1

## ANNEXE 7

## Spectres RMN de la molécule 2

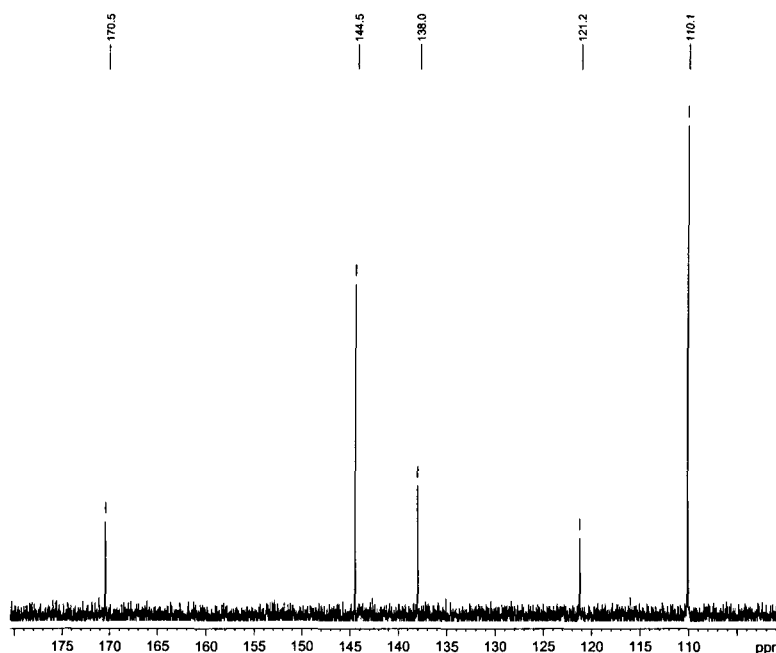
Spectre  $^1\text{H}$  de 2 dans  $\text{D}_2\text{O}$ 

Current Data Parameters  
 NAME TOP16094A  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040916  
 Time 16.27  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG zg30  
 TD 16384  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 32  
 DS 2  
 SWH 4789.272 Hz  
 FIDRES 0.292314 Hz  
 AQ 1.7105396 sec  
 RG 256  
 DW 104.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 1.00000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 11.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 8192  
 SF 400.1300000 MHz  
 WDW no  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

Spectre  $^{13}\text{C}$  de 2 dans  $\text{D}_2\text{O}$ 

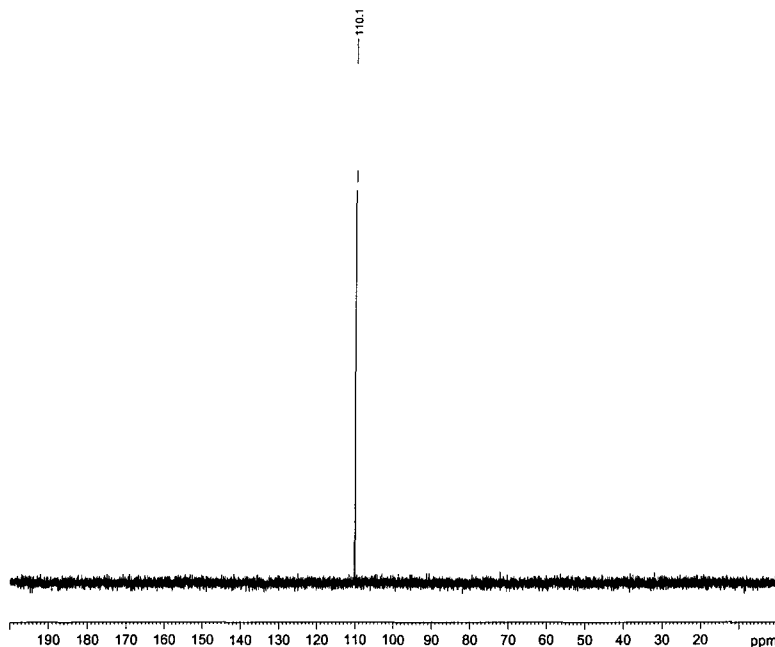
Current Data Parameters  
 NAME TOP16094A  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040916  
 Time 19.06  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 4096  
 DS 2  
 SWH 24154.590 Hz  
 FIDRES 0.368570 Hz  
 AQ 1.3566452 sec  
 RG 456.1  
 DW 20.700 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 0.65999999 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1  $^{13}\text{C}$   
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6248425 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127690 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

Spectre DEPT 135 de 2 dans D<sub>2</sub>O

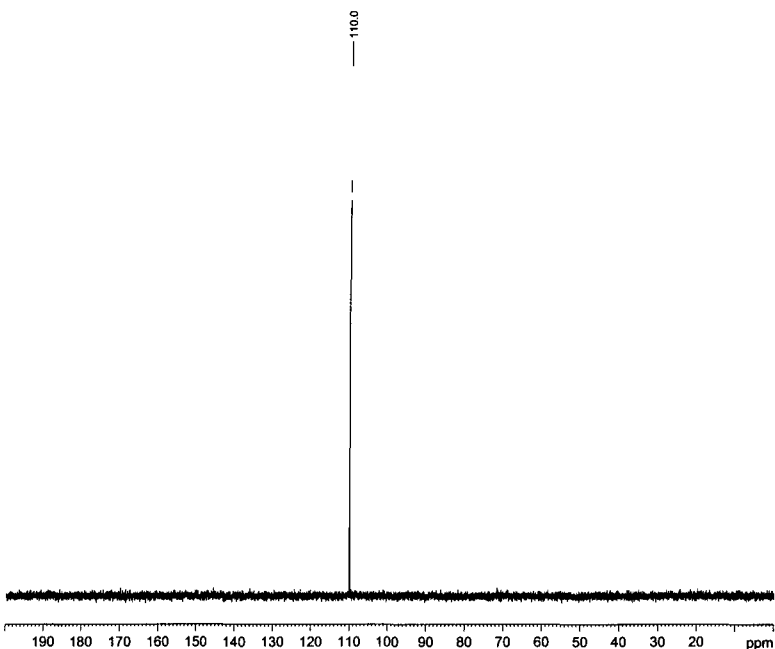
Current Data Parameters  
 NAME TOP16094A  
 EXPNO 3  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040916  
 Time 20.05  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG dept135  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 1024  
 DS 2  
 SWH 20080.320 Hz  
 FIDRES 0.306401 Hz  
 AQ 1.6316954 sec  
 RG 16384  
 DW 24.900 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 CNST2 140.0000000  
 D1 2.00000000 sec  
 d2 0.00357143 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 DELTA 0.00001273 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 p2 20.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6228303 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 P3 11.00 usec  
 p4 22.00 usec  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127890 MHz  
 WDW EM

Spectre DEPT 90 de 2 dans D<sub>2</sub>O

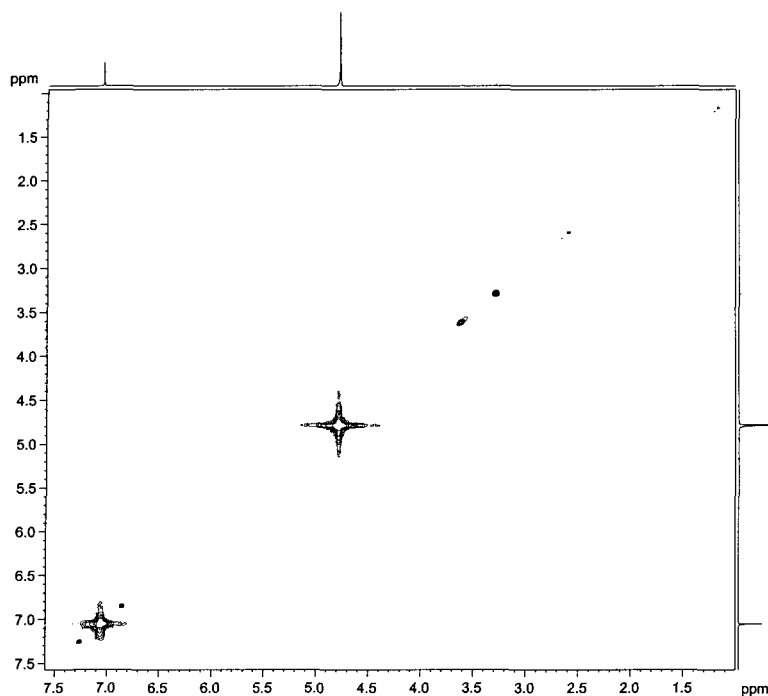
Current Data Parameters  
 NAME TOP16094A  
 EXPNO 4  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040916  
 Time 21.06  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG dept90  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 1024  
 DS 4  
 SWH 23980.814 Hz  
 FIDRES 0.365918 Hz  
 AQ 1.3664756 sec  
 RG 16384  
 DW 20.850 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 CNST2 140.0000000  
 D1 2.00000000 sec  
 d2 0.00357143 sec  
 d12 0.00002000 sec  
 DELTA 0.00001273 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 p2 20.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6228298 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 P3 11.00 usec  
 p4 22.00 usec  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127890 MHz  
 WDW EM

Spectre COSY de **2** dans D<sub>2</sub>O

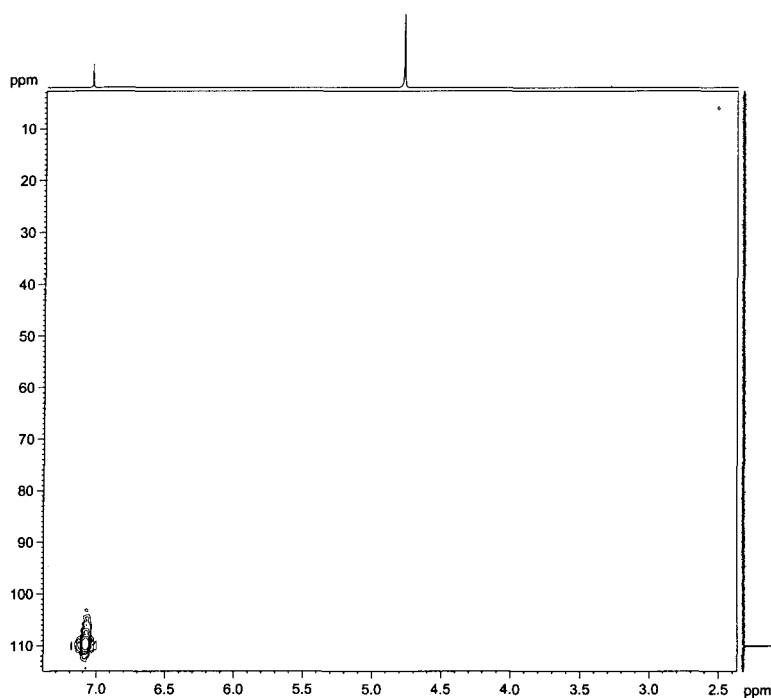
Current Data Parameters  
NAME TOP15094A  
EXPNO 5  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20040918  
Time 21:08  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
PULPROG cosygpgf  
TD 2048  
SOLVENT DMSO  
NS 4  
DS 16  
SWH 4789.272 Hz  
FIDRES 2.338512 Hz  
AQ 0.2138812 sec  
RG 1824.6  
DW 104.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
d0 0.00000300 sec  
D1 1.48689198 sec  
d13 0.00000400 sec  
D16 0.00020000 sec  
IN0 0.00020800 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRK 1.48689198 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P0 11.00 usec  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====  
GPNAM1 SINE.100  
GPNAM2 SINE.100  
GPX1 0.00 %  
GPX2 0.00 %  
GPY1 0.00 %  
GPY2 0.00 %  
GPZ1 10.00 %  
GPZ2 10.00 %  
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters  
ND0 1  
TD 256

Spectre HMQC de **2** dans D<sub>2</sub>O

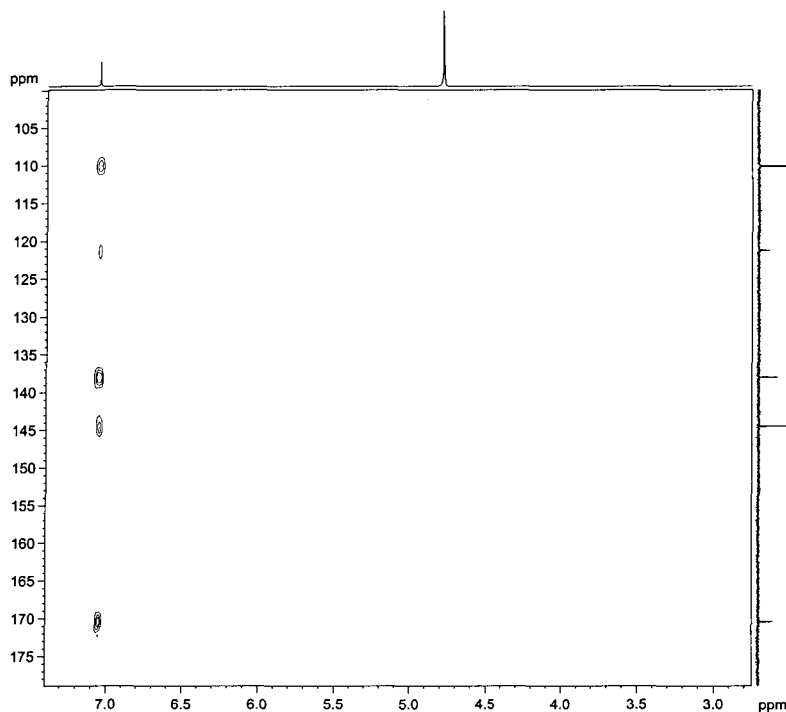
Current Data Parameters  
NAME TOP15094A  
EXPNO 6  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20040918  
Time 21:39  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/1  
PULPROG hmqcpgf  
TD 1024  
SOLVENT CDCl3  
NS 8  
DS 16  
SWH 4789.272 Hz  
FIDRES 4.677023 Hz  
AQ 0.1069556 sec  
RG 2608  
DW 104.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
CNST2 145.000000  
d0 0.00000300 sec  
D1 1.50000000 sec  
d2 0.00344828 sec  
d12 0.00002000 sec  
d13 0.00000400 sec  
D16 0.00020000 sec  
DELTA1 0.00222428 sec  
IN0 0.00003106 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRK 1.50000000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
p2 22.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
CPDPRG2 garp  
NUC2 13C  
P3 10.00 usec  
PCPD2 70.00 usec  
PL2 0.00 dB  
PL12 18.90 dB  
SFO2 100.6208180 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====

Spectre HMBC de 2 dans D<sub>2</sub>O

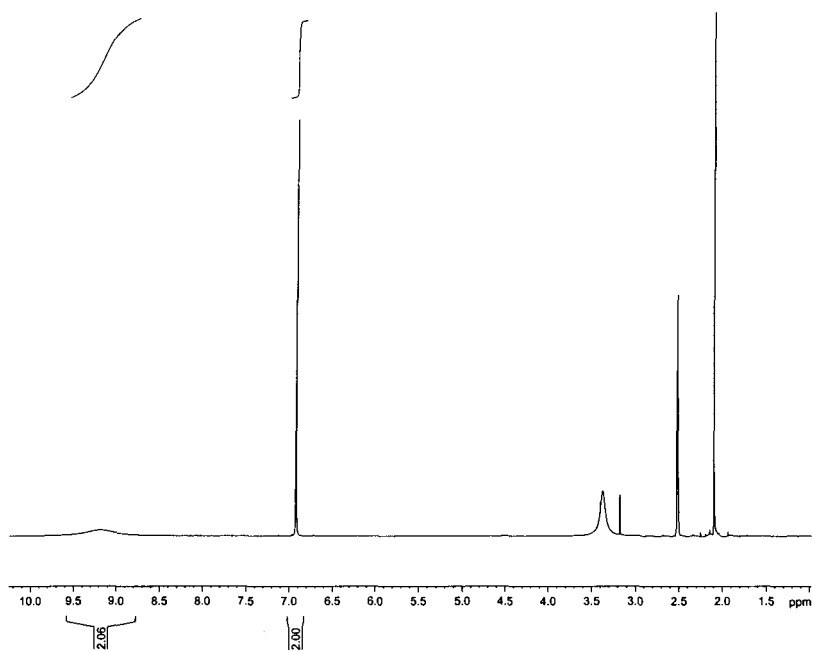
Current Data Parameters  
 NAME TOP16094A  
 EXPNO 7  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040918  
 Time 22.07  
 INSTRUM av400  
 PROBDH 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG hmtcspipndqf  
 TD 2048  
 SOLVENT DMSO  
 NS 16  
 DS 16  
 SWH 4789.272 Hz  
 FIDRES 2.338512 Hz  
 AQ 0.2138612 sec  
 RG 16384  
 DW 104.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 CNST2 140.000000  
 CNST13 10.000000  
 d0 0.0000300 sec  
 D1 1.50000000 sec  
 d2 0.00357143 sec  
 d6 0.05000000 sec  
 D16 0.00020000 sec  
 INO 0.00002070 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 1.50000000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 11.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 SFO1 400.1324008 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 NUC2 13C  
 P3 10.00 usec  
 PL2 0.00 dB  
 SFO2 100.6248425 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====  
 GPNAM1 SINE.100  
 GPNAM2 SINE.100  
 GPNAM3 SINE.100  
 GPX1 0.00 %

Spectre <sup>1</sup>H de 2 dans (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

Current Data Parameters  
 NAME TOP13094A  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040913  
 Time 16.59  
 INSTRUM av400  
 PROBDH 5 mm QNP 1H/1  
 PULPROG zg30  
 TD 16384  
 SOLVENT DMSO  
 NS 64  
 DS 2  
 SWH 4789.272 Hz  
 FIDRES 0.282314 Hz  
 AQ 1.7105396 sec  
 RG 256  
 DW 104.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 1.00000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 11.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters  
 S1 8192  
 SF 400.1300000 MHz  
 WDW no  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40



## ANNEXE 8

### Liste des abréviations

APCI	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
CCM	Chromatographie sur couche mince
COSY	« COrelated SpectroscopY »
DAD	« Diode Array Detector »
DEPT	« Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer »
ESI	« ElectroSpray Ionisation »
FT	Transformée de Fourier
GC	Chromatographie Gazeuse
GPS	Système de Positionnement Global
HMBC	« Heteronuclear Multiple Bond Connectivity »
HMQC	« Heteronuclear Multiple Quantum Coherence »
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HR	Haute Résolution
IR	InfraRouge
LC	Chromatographie Liquide
MS	Spectrométrie de Masse
MSD	Détecteur à Spectrométrie de Masse
NMR	Voir RMN
NOESY	« Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY »
NP/PEG	« Natural Products - PolyEthylenGlycol reagent »
TLC	« Thin Layer Chromatography » (voir CCM)
TOF	« Time Of Flight »
Rf	« Retention Factor »
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TOCSY	« TOtal Correlation SpectroscopY »