

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

VALORISATION DE L'EAU DE DÉROULAGE DE BOULEAU À PAPIER (*BETULA
PAPYRIFERA*) POUR DES USAGES COSMÉCEUTIQUES

PAR
VALENTINE COICAUD
B.Sc. (CHIMIE DES PRODUITS NATURELS)

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

2021

RÉSUMÉ

Dans un contexte de récupération des déchets forestiers, l'entreprise Industries John Lewis (IJL) cherche depuis plusieurs années à valoriser l'un de ses résidus industriels : l'eau de déroulage de bouleau. Cette eau, brune et turbide, s'écoule à raison de 6000 à 8000 litres par jour des troncs de bouleau à papier, et était jetée dans sa totalité avant qu'un projet de valorisation ne soit initié entre IJL et le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE). Des travaux préliminaires réalisés au LASEVE ont révélé que l'extrait enrichi de l'eau de déroulage possédait un potentiel antioxydant. Cette activité étant très recherchée dans le domaine de la cosmétologie, le but de ce projet était donc de préparer un extrait actif pouvant être utilisé dans des formulations cosmétiques et d'identifier les molécules responsables son activité biologique.

Un extrait enrichi en composés phénoliques a été produit à partir de l'eau de déroulage de bouleau. La méthode d'extraction a été développée en utilisant des solvants peu toxiques (eau et éthanol) afin d'obtenir un extrait exploitable dans le secteur des cosmétiques.

Un travail de fractionnement a par la suite été réalisé sur l'extrait enrichi. Le suivi biologique des étapes de fractionnement a permis l'isolation et l'identification de dix composés purs dont la majorité possède un fort potentiel antioxydant mesuré à l'aide du test ORAC : le lyonirésinol (ORAC 15 ± 2 $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le carpinontriol A (ORAC 29 ± 8 $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le lyoniside (ORAC 10 ± 3 $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le nudiposide (ORAC 10 ± 3 $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le betulatétranol (ORAC $18,6 \pm 0,4$ $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le glucoside de lyonirésinol (ORAC $10,1 \pm 0,3$ $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose, le glucoside d'hannokinol (ORAC $22,3 \pm 0,3$ $\mu\text{mol Trolox/mg}$), le koaburaside monométhyl éther et le kelampayoside A. Parmi ces molécules, quatre n'avaient pas été isolées de l'eau de déroulage lors des travaux préliminaires (glucoside de lyonirésinol, rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose, glucoside d'hannokinol et koaburaside monométhyl éther), une n'avait jamais été isolée de plantes de la famille des *Betulaceae* (koaburaside monométhyl éther) alors qu'une n'avait jamais été rapportée dans la littérature (rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose).

En plus de présenter une bonne activité antioxydante, l'extrait enrichi s'est révélé non toxique pour les cellules de la peau. Ainsi, cet extrait a pu être fourni au laboratoire Boréaderme pour des tests de formulation cosmétique qui ont mené à la création d'une première gamme cosmétique désormais commercialisée : la gamme *Betula* du laboratoire Boréaderme.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XI
INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE 1	4
ÉTAT DES CONNAISSANCES ET OBJECTIFS	4
1.1 Le bouleau à papier	5
1.2 L'eau de déroulage de bouleau	7
1.3 Travaux préliminaires	9
1.3.1 Résumé des travaux	9
1.3.2 Familles de molécules isolées.....	11
1.4 Oxydation de la peau et activité antioxydante	13
1.5. Objectifs	15
1.5.1. Objectif principal	15
1.5.2. Objectifs spécifiques.....	15
CHAPITRE 2	16
RÉSULTATS ET DISCUSSION	16
2.1. Étude phytochimique de l'eau de déroulage de bouleau	17
2.1.1. Optimisation de la méthode d'extraction.....	17
2.1.2. Fractionnement	21
2.2. Bilan du fractionnement.....	37
2.2.1. Activité antioxydante.....	39
2.2.2. Autres activités testées	41
CHAPITRE 3	42
MATÉRIEL ET MÉTHODES	42
3.1. Aspect général pour les extractions, purifications et analyses	44
3.1.1. Analyses	44
3.1.2. Travaux d'extraction et de purification	45
3.2. Étude phytochimique de l'eau de déroulage de bouleau	46

3.2.1. Extraction	46
3.2.2 Fractionnement	47
3.3. Tests biologiques	61
3.3.1. Activité cytotoxique <i>in vitro</i>	62
3.3.2. Activité antioxydante	63
3.3.3. Activité anti-inflammatoire	64
CONCLUSION	65
LISTE DES RÉFÉRENCES	68
ANNEXES	74
Annexe 1 : liste des molécules isolées de l'eau de déroulage lors des travaux préliminaires	74
Annexe 2 : comparaison des chromatogrammes HPLC-MS de l'extrait brut produit au méthanol (A) et à l'éthanol (B)	77
Annexe 3 : Fraction D4 enrichie en carpinontriol A.....	78
Annexe 4 : Fraction D6	79
Annexe 5 : Spectres RMN du composé 16 (lyonirésinol)	80
Annexe 6 : Spectres RMN du composé 2 (carpinontriol A).....	82
Annexe 7 : Spectres RMN du composé 5 (lyoniside)	84
Annexe 8 : Spectres RMN du composé 6 (nudiposide).....	86
Annexe 9 : Spectres RMN du composé 3 (bétulatetraol)	88
Annexe 10 : Spectres RMN du composé 7 (glucoside de lyoniresinol)	90
Annexe 11 : Spectres RMN du composé 19 (rhamnoside de trimethoxyphenyl syringoyl glucose)	92
Annexe 12 : Spectres RMN du composé 20 (glucoside d'hannokinol).....	96
Annexe 13 : Spectres RMN du composé 21 (koaburaside monométhyl éther)	100
Annexe 14 : Spectres RMN du composé 1 (kelampayoside A)	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Utilisations médicinales du bouleau blanc par les premières nations	6
Tableau 2 : Résultats de production d'extrait brut.....	18
Tableau 3 : Résultats des tests biologiques sur les extraits produits à partir des 3 lots d'eau de déroulage de bouleau	21
Tableau 4 : Résultats des tests biologiques des fractions A à G	22
Tableau 5 : Résultats des tests biologiques des fractions D1 à D7	25
Tableau 6 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplages pour chaque position du composé 19	31
Tableau 7 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplages pour chaque position du composé 21	35
Tableau 8 : Activités antioxydantes cellulaires et ORAC des composés purs isolés en quantité suffisante pour tests biologiques	39
Tableau 9 : Conditions d'analyse HPLC des échantillons sur colonne biphenyle	44
Tableau 10 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplage pour chaque position du composé 19	58
Tableau 11 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplage pour chaque position du composé 21	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Bouleau à papier (<i>Betula papyrifera</i>).....	5
Figure 2 : Structure des composés isolés de l'eau de déroulage lors des travaux préliminaires : kelampayoside A 1 , carpinontriol A 2 , bétulatétraol 3 , smiglabranol xyloside 4 , lyoniside 5 , nudiposide 6 , glucoside de lyonirésinol 7 , smiglabranol glucoside 8 , bétuladiol glucoside 9 , alnusdiol 10 , triméthoxyphényl-syringoyl-glucopyranoside 11	10
Figure 3 : Structure de la salicyline 12	11
Figure 4 : Exemple de monolignols précurseurs des lignanes : alcool para-coumarylique (13) et alcool coniférylique (14).....	12
Figure 5 : Structure du papyriféroside A 15 (diarylheptanoïde linéaire) et du carpinontriol A 2 (diarylheptanoïde cyclique).....	13
Figure 6 : Extrait brut enrichi en composés phénoliques obtenu à partir de l'eau de déroulage de bouleau	18
Figure 7 : Analyse CCM de l'extrait brut et des témoins isolés précédemment (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H ₂ SO ₄ 20% dans le méthanol)	20
Figure 8 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait brut sur colonne diaion HP-20 : fractions A à G (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H ₂ SO ₄ 20% dans le méthanol)	22
Figure 9 : Analyse CCM du fractionnement de D+E sur colonne de silice : fractions D1 à D9 (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H ₂ SO ₄ 20% dans le méthanol).....	24
Figure 10 : Structure du lyoniside 5 , du nudiposide 6 et du bétulatétraol 3	27
Figure 11 : Chromatogramme HPLC-MS du mélange lyoniside-nudiposide sur colonne C18.....	28
Figure 12 : Chromatogramme HPLC-préparative du mélange lyoniside-nudiposide sur colonne chirale Regispack 5 Micron.....	28
Figure 13 : Structure de 19 identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.	30
Figure 14 : structure de 20 identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.	33
Figure 15 : Analyse CCM du fractionnement de C sur colonne de silice : fractions C1 à C6 (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H ₂ SO ₄ 20% dans le méthanol).....	34
Figure 16 : structure de 21 identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.	35
Figure 17 : Schéma de fractionnement pour obtenir les composés purs à partir de l'eau de déroulage de bouleau	37
Figure 18 : Structure des composés isolés de l'eau de déroulage de bouleau	38
Figure 19 : Structure du (+)-lyonirésinol 16	52
Figure 20 : Structure du carpinontriol A 2	53
Figure 21 : Structure du lyoniside 5	54
Figure 22 : Structure du nudiposide 6	55
Figure 23 : Structure du bétulatétraol 3	55
Figure 24 : Structure du glucoside de lyonirésinol 7	56

Figure 25 : Structure du rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose 19	57
Figure 26 : Structure du glucoside d'hannokinol 20	59
Figure 27 : Structure du koaburaside monométhyl éther 21	60
Figure 28 : Structure du kelampayoside A 1	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^{13}C = Carbone 13.

^1H = Proton.

AAPH = 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride

ADN = Acide Désoxyribonucléique.

CD_3OD = Méthanol deutéré.

CCM = Chromatographie sur Couche Mince.

CHCl_3 = Chloroforme.

CO_2 = Dioxyde de carbone.

COSY = COrrrelation SpectroscopY.

DCFH-DA = 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate.

DEPT135 = Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer.

DMSO = DiMethyl SulfOxide.

FAO = Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FTIR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Spectroscopie Infra-rouge à Transformée de Fourier).

g = Gramme.

H_2O = Eau.

H_2SO_4 = Acide Sulfurique.

HBSS = Hank's Balanced Salt Solution.

HCOOH = Acide formique.

HMBC = Heteronuclear Multiple-Bond Correlation.

HPLC = High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance).

HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence.

IC_{50} = Concentration inhibitrice médiane.

IJL = Industries John Lewis.

IPA = Iso Propyl Alcohol.

J = Constante de couplage.

L = Litre.

L-NAME = N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride.

LASEVE = Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales.

m = Masse.

MeOH = Méthanol.

MHz = Méga-Hertz.

min = Minutes.

mL = Millilitre.

MS = Mass Spectrometry.

nm = Nanomètre.

NO = Nitric Oxide (oxide nitrique).

ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PBS = Phosphate Buffer-Saline.

PFNL = Produits Forestiers Non Ligneux.

pH = Potentiel Hydrogène.

ppm = Partie Par Million.

R = rendement.

R_f = Rapport Frontal.

Ref = Référence.

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire.

ROS = Reactive Oxygen Species (Réactifs dérivés de l'oxygène).

t-BuOOH = tert-butylhydroperoxide.

TE = Trolox.

UV = Ultra-Violet.

V = Volume.

var. = Variété.

μL = Microlitre.

μm = Micromètre.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur André Pichette ainsi que mon codirecteur Jean Legault pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet en lien avec mes aspirations professionnelles. Ils m'ont offert une expérience très enrichissante qui m'a beaucoup apporté autant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens aussi à remercier François Simard, qui m'a supervisée tout au long de ce projet, pour son aide précieuse. Il a su me guider au quotidien tout en me laissant devenir autonome dans mes manipulations et mes décisions. C'est en grande partie grâce à lui que j'ai pu développer ma confiance en moi au laboratoire.

J'adresse aussi mes remerciements à Lionel Ripoll, qui a perçu mon intérêt pour la cosmétologie et qui m'a accordé sa confiance pour l'aider en tant que correctrice et pour effectuer quelques formulations cosmétiques. Il a su me transmettre ses connaissances depuis mon stage à ses côtés il y a maintenant trois ans.

Un grand merci à Balla Sylla, Jérôme Alsarraf et Vakhtang Mshvildadze pour leurs précieux conseils mais aussi pour leur bonne humeur qui a toujours su me faire sourire même lors des plus mauvais jours.

Je remercie aussi l'équipe qui a réalisé tous les tests biologiques : Karl Lalancette, Catherine Dussault et Audrey Bélanger, qui se sont tous les trois montrés disponibles et attentifs à chacune de mes interrogations.

Je voudrais aussi remercier Germain Savard, Dominique Simard et Jacques Ibarzabal pour m'avoir accompagnée dans mes soucis administratifs tout au long de ma maîtrise et pour leur joie de vivre communicative.

Je tiens à remercier les collègues, désormais précieux amis, que j'ai croisés au cours de ces trois ans au Québec pour leur aide et pour leur bonne humeur aussi bien au laboratoire qu'à l'extérieur. Je remercie particulièrement Anne Ardaillou et Fanny Charlier avec qui je partage cette aventure depuis le début.

Et pour finir, j'adresse un immense merci à mes parents, à mon frère, et à Nicolas Chabalière pour m'avoir donné le courage de vivre une partie de ma vie au Québec et qui m'ont apporté tout le soutien et l'amour dont j'avais besoin pour vivre loin d'eux.

INTRODUCTION

La forêt boréale, du latin *borealis* (« du Nord »), est une précieuse richesse du Québec, territoire dont elle recouvre plus du tiers de la superficie¹. La forêt boréale est un atout aussi bien au niveau de la biodiversité que pour l'économie québécoise. En effet, elle abrite plus de 850 espèces de plantes vasculaires¹ et plus de 200 000 emplois sont créés au Québec pour l'industrie forestière générée par la forêt boréale². L'importance est aussi culturelle : la forêt boréale est la terre ancestrale des peuples autochtones, dont le savoir immense concernant l'usage des plantes médicinales provient essentiellement de ce territoire.

La majeure partie de la forêt boréale est peuplée par des conifères, principalement par l'épinette noire (*Picea mariana*). Toutefois, 25% des arbres la forêt boréale sont représentés par les feuillus, parmi lesquels deux espèces prédominent : le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) et le bouleau blanc (*Betula papyrifera*)¹. Une grande partie de ces arbres est récoltée par l'industrie forestière, majoritairement pour la fabrication du papier et le bois d'œuvre, c'est le cas notamment du *Betula papyrifera*.

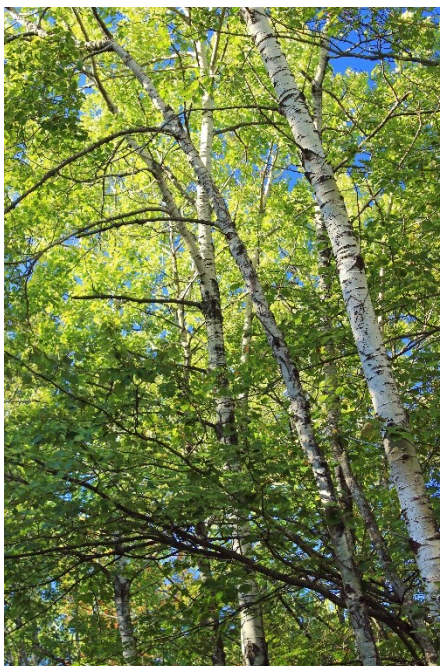
Cependant, de nombreuses ressources de la forêt restent inexplorées, c'est pour cela que les entreprises recherchent de plus en plus à valoriser la biomasse et les produits forestiers non ligneux (PFNL), pour l'instant faiblement exploités. Cette démarche s'inscrit notamment dans le nouveau régime forestier du Québec. En effet, pour répondre aux enjeux climatiques actuels auxquels le monde fait face, un nouveau régime forestier a été mis en vigueur le 1^{er} avril 2013, ayant pour principal objectif la gestion durable des territoires forestiers du Québec. Les PFNL sont décrits par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) comme étant des « biens d'origine biologique autre que le bois, dérivés des forêts, d'autres terres boisées et des arbres hors forêts »³. Leur valorisation présente un avantage à la fois écologique et économique. En plus d'aider à la conservation de la diversité biologique de la forêt boréale, la production de PFNL apporte aussi une solution à une crise de l'industrie forestière dans laquelle le Québec a été plongé à la fin du XX^e siècle⁴. Ainsi, plusieurs entreprises spécialisées dans les PFNL se développent, tandis que d'autres déjà connues pour leurs produits ligneux cherchent désormais à valoriser leurs résidus forestiers. C'est le cas de l'entreprise Industries John Lewis (IJL) située à La Tuque, au Québec. Elle

se spécialise dans la transformation du bouleau blanc de la région de la Mauricie, majoritairement en bâtonnets pour une utilisation alimentaire. Dans une démarche de développement durable et en cohérence avec le nouveau régime forestier, IJL prend part à de nombreuses actions : un aménagement durable du territoire forestier, une utilisation de 100% du bois coupé, ainsi que la récupération des résidus forestiers⁵. Parmi ces derniers, l'eau de déroulage de bouleau semble être une ressource intéressante à exploiter. Ce résidu industriel est produit à raison de 6000 à 8000 litres par jour lors de l'opération de déroulage, c'est-à-dire la découpe du bouleau en feuilles de bois d'épaisseur uniforme dans lesquelles sont taillés les bâtonnets. L'eau qui découle de ce processus, généralement appelée eau de déroulage, est jetée dans sa quasi-totalité malgré une riche composition. L'eau de déroulage de bouleau n'ayant fait l'objet d'aucune étude, il semblait donc très opportun d'en étudier la composition chimique et les potentiels effets afin de procéder à sa valorisation. C'est ainsi qu'un projet de valorisation de ce résidu a été mis en place depuis 2016 entre le LASEVE et l'entreprise IJL. Les travaux préliminaires, réalisés il y a deux ans par le LASEVE, ont montré que l'eau possédait un potentiel antioxydant. Celui-ci donne l'opportunité d'une valorisation dans le secteur des cosmétiques. Cette dernière s'inscrit aussi dans une nouvelle tendance de réutilisation de sous-produits d'origine végétale en ingrédients cosmétiques⁶.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES ET OBJECTIFS

1.1 LE BOULEAU A PAPIER



(CC BY) Nicholas A. Tonelli, <https://pxhere.com/fr/photo/109976>

Figure 1 : Bouleau à papier (Betula papyrifera)

Le bouleau à papier (*Betula papyrifera*) (Figure 1), aussi appelé bouleau blanc ou bouleau à canot, est une espèce emblématique du Canada de la famille des *Betulaceae* qui se retrouve à travers presque tout le territoire⁷. Son écorce possède une haute teneur en molécules lipophiles (comme le bétulinol) qui la rendent imperméable. Du fait de cette propriété, elle était autrefois utilisée par les Indiens d'Amérique dans le domaine de la construction notamment pour la fabrication de revêtement de canots, d'où le nom de bouleau à canot⁸. Toutefois, les usages du bouleau blanc ne se limitent pas qu'à la construction. Les différentes parties de l'arbre étaient en effet utilisées par les premières nations pour résoudre plusieurs problèmes de santé comme indiqué au Tableau 1.

Du fait des nombreux usages autochtones de ses différentes espèces, le genre *Betula* a déjà fait l'objet de certaines recherches sur sa composition et ses activités biologiques. Aujourd'hui, les propriétés pharmacologiques du bouleau sont principalement attribuées à ses feuilles et ses écorces. Ce sont ces deux parties de l'arbre qui ont été les plus étudiées, permettant désormais d'avoir accès

à une liste complète des principales molécules qui les composent. Les feuilles du bouleau contiennent entre autres jusqu'à 3 % de flavonoïdes qui lui confèrent son activité diurétique⁹, des acides phénoliques connus (chlorogénique, caféique), ainsi que des tanins. Son écorce, quant à elle, contient des aryl- et diarylheptanoïdes¹⁰. Le bouleau est également connu pour ses dérivés lupaniques présents à la fois dans les feuilles et l'écorce, notamment le bétulinol. Ce dernier a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de démontrer les propriétés anti-inflammatoire, cicatrisante et métabolique du bouleau^{11, 12}.

Tableau 1 : Utilisations médicinales du bouleau blanc par les premières nations

Partie utilisée	Forme	Utilisation	Nation
Feuilles	Cataplasme	Antipoison	Chipewyan ¹³
		Traitement des piqûres d'insectes	Déné ¹⁴
Tiges et branches	Décoction	Maux de dents	Cri ¹⁵
		Maux de ventre	Déné ¹⁶
Bourgeons	Pommade	Application sur les blessures	Cri ¹⁷
Bois	Décoction	Maux de dos, nettoyant topique	Cri ^{15, 17}
Écorce interne	Inhalation	Asthme	Cri ¹⁸
	Décoction	Douleurs menstruelles	Métis ¹⁸ , Déné ¹⁹
	Gargarisme	Maux de gorge	Métis ¹⁸
	Cataplasme	Coupures infectées	Malécite ²⁰
	Pommade	Plaies et éruptions cutanées	Cri ¹⁵
	Décoction	Maux de ventre	Déné ¹⁴
Écorce externe	Plâtre	Membre cassé ou enflé	Cri ¹⁸ , Déné ¹⁹
	Poudre	Poudre de bébé	Ojibway ²¹
	Décoction	Antidiarrhéique	Montagnais ²²
	Compresse	Abcès	Cri ²³
Racines	Décoction	Douleurs menstruelles	Déné ¹⁸
Sève	Décoction	Santé générale, problèmes respiratoires	Déné ¹⁹
		Douleurs gastro-intestinales	
		Douleurs gynécologiques	Ojibwas ²⁴ Iroquois ²⁴

Encore actuellement, le bouleau à papier est toujours une espèce ligneuse très valorisée au Québec. Désormais, c'est principalement son bois qui est utilisé car il présente des caractéristiques intéressantes. Tout d'abord, sa couleur pâle est attrayante pour la fabrication de meubles, planchers et autres éléments de mobilier, mais elle est aussi très intéressante pour l'industrie de pâtes et papier puisqu'elle nécessite peu d'opérations de blanchiment²⁵. De plus, le bois de bouleau blanc a la

particularité de ne posséder aucune odeur et aucun goût, faisant de ce bois le plus utilisé pour la fabrication d'objets à portée alimentaire (cure-dents, bâtonnets de crème glacée ou de tire d'érable...). C'est dans ce dernier contexte qu'est produit en quantité non négligeable un résidu forestier dont la composition et le potentiel biologique restent encore méconnus : l'eau de déroulage de bouleau.

1.2 L'EAU DE DÉROULAGE DE BOULEAU

L'eau de déroulage, comme son nom l'indique, est produite lors de l'opération de déroulage, c'est-à-dire la découpe du tronc de bouleau en feuilles de bois dans lesquelles sont taillés des bâtonnets (crème glacée, tire d'érable). Ce résidu industriel est presque totalement jeté (environ 7000 litres/jour) sans pour autant avoir été étudié auparavant. En effet, ni la composition ni le potentiel biologique de ce déchet forestier ne sont connus.

Il est important de noter que l'eau de déroulage de bouleau n'est pas identique à l'eau de bouleau qui peut être retrouvée comme boisson dans le commerce. L'eau de bouleau, contrairement à l'eau de déroulage, correspond à la sève qui s'écoule des arbres et qui est utilisée pour fabriquer le sirop de bouleau. Il s'agit d'un liquide translucide dont la consommation est ancestrale (Tableau 1). L'eau de déroulage, elle, est rougeâtre et turbide, et obtenue par action mécanique. Cette coloration est un premier indice qui montre que la composition chimique de l'eau de déroulage est plus riche que celle de la sève. La couleur marron-rouge peut s'expliquer par l'oxydation des composés phénoliques présents dans l'eau de déroulage²⁶. Celle-ci peut être accélérée par des enzymes libérées lors de l'action de la lame comprimant le bois de bouleau. D'ailleurs, l'action mécanique peut aussi expliquer la composition plus complexe de l'eau de déroulage par rapport à celle de la sève. La lame provoque en effet l'éclatement de certaines structures végétales telles que les cellules, enrichissant ainsi la sève initiale pour obtenir l'eau de déroulage.

Même si la littérature a déjà mis en lumière plusieurs fois les eaux de différents *Betula*, les connaissances sur leur composition et leur activité restent faibles comparativement à celles sur

l'écorce et les feuilles. Pour résumer brièvement l'état des connaissances concernant la composition de ces eaux, deux études des années 1960 ont tout d'abord déterminé la présence d'un polysaccharide, de disaccharides et de monosaccharides dans l'eau de *Betula papyrifera*^{27, 28}. La présence de ces sucres a également été confirmée par une équipe finlandaise dans *Betula pubescens*, *Betula pendula* Roth et *Betula pendula* var. Carelica en plus de la découverte d'acides organiques (malique, succinique)²⁹. D'autre part, le sirop de *Betula pubescens* a aussi été étudié. Sa composition est semblable à celle de l'eau à partir de laquelle il a été préparé, et la présence d'acides aminés (citrulline, glutamine, acide glutamique) a été relevée³⁰⁻³³. Des études coréennes ont rapporté des analyses de *Betula platyphylla*, *Betula costata* et *Betula davurica* qui rejoignent les travaux de l'équipe finlandaise et montrent la présence de quelques nucléosides³⁴.

Concernant les activités biologiques, celles-ci sont connues grâce à l'usage traditionnel des eaux de bouleau. Le breuvage était utilisé notamment contre l'arthrite, les calculs rénaux et les maladies de la peau³⁵. Le bouleau blanc (*Betula papyrifera*) était aussi utilisé par de nombreuses tribus autochtones en décoction : par les Ojibwas et les Iroquois pour réduire respectivement des douleurs gastro-intestinales et gynécologiques²⁴, et par les Déné pour lutter contre les problèmes respiratoires¹⁹.

De plus, les eaux de bouleau ont déjà démontré des effets *in vitro* encourageants³⁶. En effet, l'utilisation des eaux végétales en cosmétologie en tant que substituts de l'eau est actuellement en pleine émergence. Ainsi, plusieurs demandes de brevets ont été déposées depuis 2017 pour l'utilisation des eaux de bouleau en cosmétique³⁷⁻³⁹.

Finalement, les études présentées concernent seulement les eaux de bouleaux dont la composition semble être principalement représentée par des métabolites primaires. Très rares sont les métabolites secondaires qui ont été identifiés dans la sève, et aucune étude des eaux de déroulage n'a encore été effectuée. Malgré sa faible richesse en composés biologiquement actifs, la sève est commercialisée en tant que boisson stimulante du système immunitaire ou réductrice des problèmes articulaires⁴⁰, et commence à être utilisée dans le domaine de la cosmétique. Sachant que l'eau de déroulage possède une composition plus riche, il était donc très opportun d'en étudier

la composition et les effets afin de procéder à sa valorisation. Celle-ci s'inscrit aussi dans une nouvelle tendance de réutilisation de sous-produits d'origine végétale en cosmétique ⁶.

Ainsi, cette valorisation s'est surtout effectuée dans un but d'utilisation cosmétique au vu de la présence des nombreux composés phénoliques dans l'eau de déroulage, dont la présence et l'intérêt biologique ont été vérifiés lors de la première partie de ce projet.

1.3 TRAVAUX PRÉLIMINAIRES

1.3.1 RÉSUMÉ DES TRAVAUX

Les travaux préliminaires visaient l'acquisition de premières connaissances sur la méthode d'obtention d'un extrait enrichi et sur la composition chimique et le potentiel biologique de l'eau de déroulage.

Cette première phase du projet a permis de développer une première méthode de production d'un extrait enrichi à partir de l'eau de déroulage. Cette méthode consiste dans un premier temps à filtrer l'eau en plusieurs étapes (grossière, en profondeur, et stérilisante), puis à effectuer un enrichissement au méthanol sur résine diaion HP-20.

Des premiers travaux de fractionnements réalisés par Simon Gandrieau ont déjà montré la présence de 11 composés phénoliques (dont 3 nouveaux) dont certains possèdent des propriétés antioxydantes d'un intérêt certain. Ces molécules ont été identifiées comme étant 4 glycosides phénoliques, 3 lignanes et 4 diarylheptanoïdes cycliques. Leur structure est présentée à la Figure 2. Toutefois, la majeure partie de ces composés a été obtenue en trop faible quantité pour permettre leur caractérisation ou même l'évaluation de leur activité biologique.

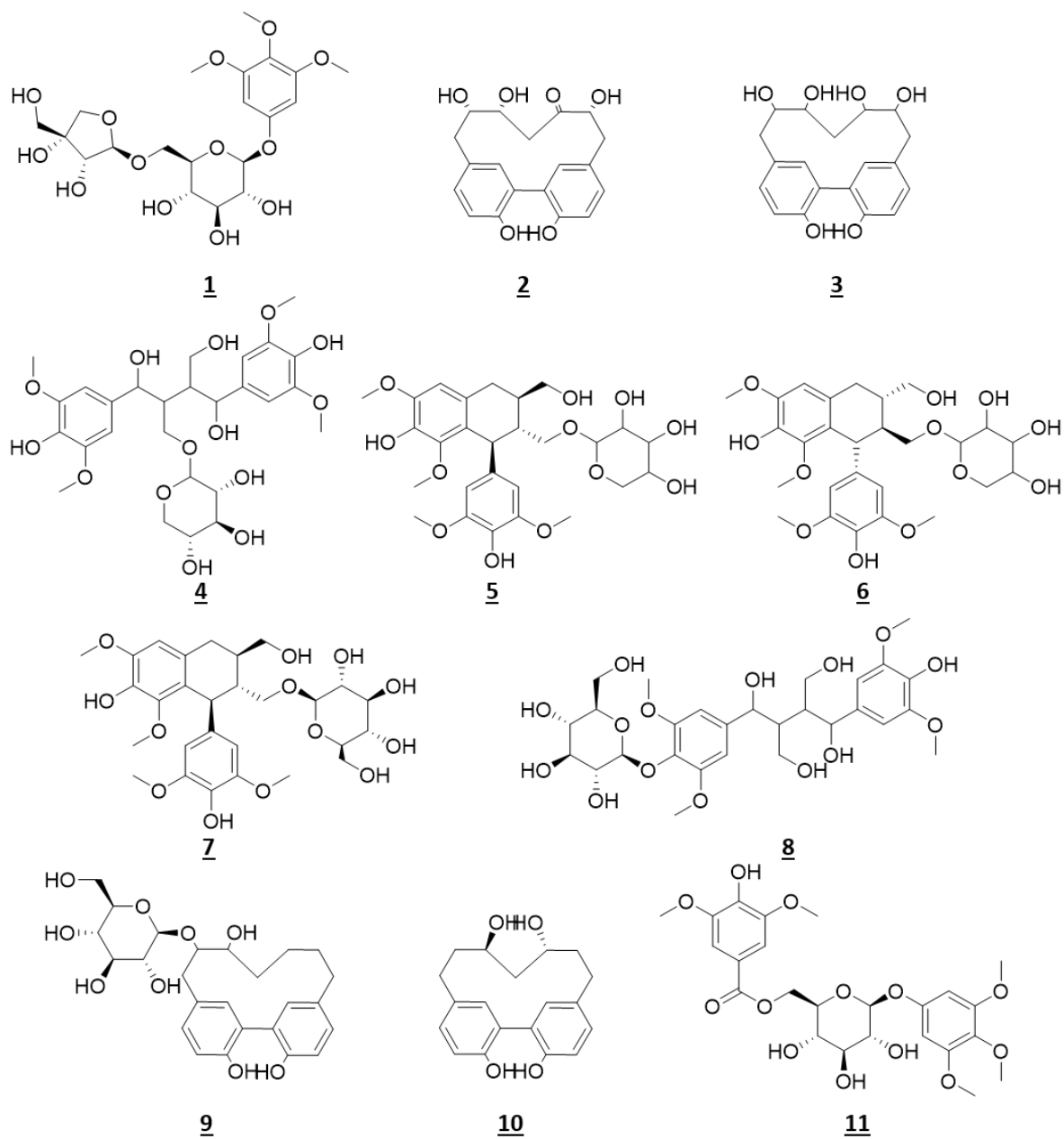


Figure 2 : Structure des composés isolés de l'eau de déroulage lors des travaux préliminaires : kelampayoside A 1, carpinontriol A 2, bétulatétraol 3, smiglabranol xyloside 4, lyoniside 5, nudiposide 6, glucoside de lyonirésinol 7, smiglabranol glucoside 8, bétuladiol glucoside 9, alnusdiol 10, triméthoxyphényl-syringoyl-glucopyranoside 11.

1.3.2 FAMILLES DE MOLÉCULES ISOLÉES

- **Glycosides phénoliques**

Les glycosides phénoliques sont des hétérosides composés d'une partie glycosidique (un ou plusieurs sucres) et d'une partie aglycone dérivée des phénols. Leur présence dans la nature est connue depuis plus d'un siècle et est très répandue. D'ailleurs, les composés phénoliques de faible poids moléculaire ont souvent tendance à se lier à un sucre dans les plantes⁴¹. La salicyline **12** est un bon exemple pour illustrer la structure et l'activité des glycosides phénoliques. Il s'agit d'un composé phénolique simple, la saligénine, lié à un β -D-glucose (Figure 3). Elle participe à l'activité anti-inflammatoire de l'écorce de saule dont elle est issue⁴². Tout comme cette molécule, un grand nombre de glycosides phénoliques se sont avérés anti-inflammatoires mais aussi antioxydants⁴³⁻⁴⁶.

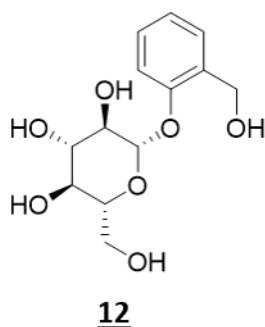


Figure 3 : Structure de la salicyline **12**

- **Lignanes**

Les lignanes sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols telles que l'alcool para-coumarylique **13** et l'alcool coniférylique **14** représentés à la Figure 4. Ces molécules se retrouvent fréquemment dans la nourriture, notamment dans les céréales et graines (particulièrement le lin), les légumes et fruits (chou, abricot, fraise) ainsi que dans le thé et le café^{47, 48}.

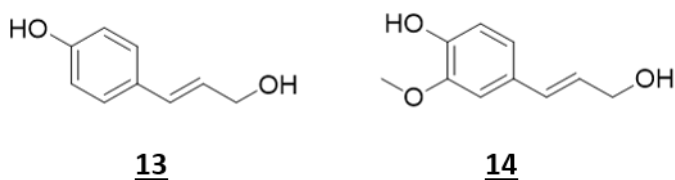


Figure 4 : Exemple de monolignols précurseurs des lignanes : alcool para-coumarylique (**13**) et alcool coniférylique (**14**)

Ils font partie des phyto-œstrogènes, c'est-à-dire des molécules naturellement issues des plantes dont la structure se rapproche de celle de l'estradiol, un composé qui impacte notamment le fonctionnement reproductif sexuel⁴⁹. L'entérodiol et l'entérolactone sont deux exemples de phyto-œstrogènes reconnus de la famille des lignanes⁵⁰. Ainsi, plusieurs études visent à analyser les interactions entre les récepteurs des œstrogènes et les lignanes, et à évaluer l'effet de ces derniers sur les risques de cancers⁵¹. La podophyllotoxine est un bon exemple de lignane ayant un effet antitumoral⁵². Les lignanes sont aussi connus, comme un grand nombre de composés phénoliques, pour leur activité antioxydante⁵³.

- **Diarylheptanoïdes**

Le squelette principal des diarylheptanoïdes se compose de deux noyaux aromatiques liés par une chaîne de sept carbones (heptane). Ils peuvent être linéaires mais existent aussi sous forme cyclique. C'est cette dernière forme qui a été adoptée par les quatre composés isolés de l'eau de déroulage au cours des travaux préliminaires. L'abondance des diarylheptanoïdes dans la nature est beaucoup moins vaste que celle des glycosides phénoliques et des lignanes. Leur présence a été relevée dans des plantes principalement de la famille des *Betulaceae*⁵⁴, des *Zingiberaceae*^{55, 56} et des *Aceraceae*⁵⁷. La curcumine, issue du *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*), est le premier diarylheptanoïde isolé et le plus réputé pour son grand potentiel pharmacologique. Plusieurs activités ont en effet été démontrées, telles qu'antioxydante, anti-inflammatoire et, plus récemment, anticancéreuse⁵⁸⁻⁶⁰. Ces activités ont aussi été retrouvées pour d'autres diarylheptanoïdes⁶¹⁻⁶³. La

présence de plusieurs diarylheptanoïdes tels que le papyriféroside A **15** a déjà été rapportée dans l'espèce *Betula papyrifera*⁶³ (Figure 5).

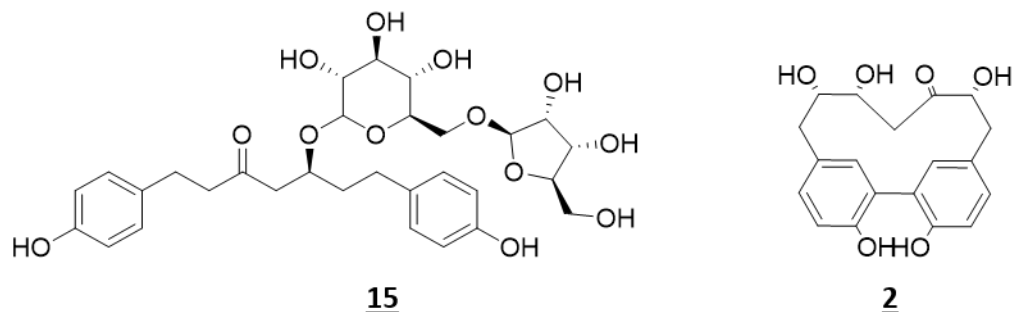


Figure 5 : Structure du papyriféroside A **15** (diarylheptanoïde linéaire) et du carpinontriol A **2** (diarylheptanoïde cyclique)

1.4 OXYDATION DE LA PEAU ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Plusieurs des molécules isolées lors des travaux préliminaires (carpinontriol A **2**, lyoniside **5**, glucoside de Lyonirésinol **7**) présentent un fort potentiel antioxydant, une activité très recherchée dans le secteur de la cosmétique notamment pour le développement de produits solaires ou anti-âge dont la demande est de plus en plus forte. Pour répondre à cette demande, il est important de comprendre les origines du vieillissement cutané.

La peau est naturellement protégée par un système antioxydant cellulaire constitué d'enzymes comme les superoxydes dismutases (SOD), la catalase ou le glutathion, mais également de vitamines telles que la vitamine A, C ou E⁶⁴. Malgré ce système antioxydant, la peau subit un vieillissement dû à la combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Les facteurs d'origine intrinsèque correspondent au vieillissement naturel de la peau. Les mitochondries sont l'une des principales sources du vieillissement intracellulaire par leur production de ROS (Reactive Oxygen Species)⁶⁵. Les ROS peuvent être des radicaux libres comme le radical

hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) ou l'anion superoxyde ($\text{O}_2^\bullet$) mais aussi des non radicaux comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ils sont responsables du stress oxydatif qui correspond à un déséquilibre entre la quantité de ROS dans l'organisme et sa capacité antioxydante⁶⁶. D'autres facteurs intrinsèques peuvent intervenir tels que l'âge qui, en augmentant, provoque une diminution des mécanismes de réparation de l'ADN (systèmes de réparation des bases et des nucléotides) et du protéasome qui agit notamment contre l'oxydation des protéines⁶⁷. Il peut également s'agir de facteurs génétiques qui varient d'une personne à une autre comme le taux d'hormones (par exemple l'œstrogène pour les femmes) ou la pigmentation de la peau. En effet, le degré de pigmentation est un facteur qui influence sur le vieillissement cutané : plus une peau est pigmentée, plus elle est constituée de mélanine qui agit comme une barrière protectrice de la peau en absorbant les rayonnements ultra-violet (UV). Ainsi, le vieillissement cutané peut être plus important chez les personnes ayant la peau plus claire⁶⁸.

La peau est aussi soumise à des facteurs extérieurs susceptibles d'accélérer son vieillissement, il s'agit des facteurs extrinsèques. Tout d'abord, le mode de vie (mauvaise alimentation, consommation de tabac et/ou d'alcool) peut amplifier le vieillissement cutané⁶⁹. Mais le facteur extrinsèque majeur est l'exposition aux rayonnements UV qui provoque le photo-vieillissement. Les UVB sont absorbés à 90% par l'épiderme (composé de kératinocytes) tandis que plus de 50% des UVA se rendent jusqu'au derme (composé de fibroblastes)⁷⁰. Les rayonnements UV peuvent altérer directement l'ADN cellulaire ou agir via des ROS⁷¹. Ce mécanisme peut provoquer de graves dommages sur l'ADN des cellules de la peau mais aussi sur les protéines et les lipides de la membrane cellulaire. Les dommages peuvent même aller jusqu'à la carcinogenèse. En effet, lorsque l'organisme est exposé à une dose trop importante d'UV, la protéine p53 est activée bloquant ainsi la division cellulaire pour permettre la réparation des dommages. Lorsque les dommages sont trop importants, p53 déclenche la mort cellulaire programmée ou apoptose des kératinocytes et des mélanocytes. Toutefois, le stress oxydatif peut induire des mutations dans l'ADN du gène de p53 provoquant ainsi l'inhibition de l'apoptose ce qui peut potentiellement mener à la formation de cellules cancéreuses⁷².

La recherche de molécules ou d'extraits capables de neutraliser les ROS est donc très importante dans la prévention du vieillissement cutané et des pathologies que peut provoquer le stress oxydatif, afin de compléter les défenses antioxydantes de la peau.

1.5. OBJECTIFS

Dans la continuité des deux premières années de recherches sur la composition complexe de l'eau de déroulage de bouleau, ce projet de maîtrise visait à poursuivre l'étude de la composition chimique et de l'activité des composés phénoliques contenus dans ce résidu forestier, ainsi qu'à évaluer le potentiel de cette matrice dans des formulations cosmétiques.

1.5.1. OBJECTIF PRINCIPAL

Valoriser un produit forestier non ligneux, l'eau de déroulage de bouleau, pour des usages cosméceutiques.

1.5.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Optimiser la méthode d'extraction pour obtenir à grande échelle un extrait enrichi utilisable en cosmétologie ;
- Isoler des composés purs en quantité suffisante pour l'évaluation de leur potentiel biologique et leur caractérisation ;
- Caractériser de manière complète chaque composé isolé ;
- Évaluer le potentiel biologique des extraits et composés purs afin de déterminer les applications possibles de l'eau de déroulage ;
- Vérifier la compatibilité de l'eau de déroulage de bouleau et de son extrait dans des formulations cosmétiques.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EAU DE DÉROULAGE DE BOULEAU

2.1.1. OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION

Dans un premier temps, il était important d'optimiser le procédé d'extraction qui a été mis au point lors des travaux préliminaires dans le but de le transposer à une plus grande échelle. Une filtration de l'eau de déroulage s'est avérée nécessaire avant le passage sur colonne afin d'éliminer toute particule en suspension dans l'eau pouvant nuire au débit de la colonne. En effet, des particules de bois de taille variant de l'ordre du micromètre au millimètre se trouvent en suspension dans l'eau de déroulage, en plus ou moins grande quantité selon les lots. Dans le cadre de la production de l'extrait brut utilisé dans ce projet, l'eau de déroulage a été filtrée sur coton. Cette méthode de filtration était suffisante pour ce projet, mais elle restera cependant à améliorer si une méthode de production à plus grande échelle devait être mise au point.

Le processus d'extraction des composés phénoliques consistait à filtrer l'eau de déroulage à travers la résine diaion HP-20 sur laquelle les composés phénoliques sont restés adsorbés. Le rinçage à l'eau a permis d'éliminer les molécules ayant le plus d'affinité avec l'eau, c'est-à-dire les molécules très polaires. Il s'agit en grande majorité de sucres, d'un intérêt mineur pour ce projet. L'extrait a été obtenu en utilisant un solvant de polarité inférieure à celle de l'eau pour entraîner les composés phénoliques hors de la colonne. C'est l'éthanol qui a été choisi pour procéder à l'extraction. Il s'agit d'un solvant très souvent employé dans la production d'extraits cosmétiques, du fait de sa toxicité inférieure à celle du méthanol. Ainsi, ce solvant a été préféré lors de ce projet pour la production d'extrait brut enrichi en composés phénoliques. L'extrait obtenu peut alors à la fois être utilisé pour l'isolation des composés phénoliques et pour des tests de formulation cosmétique.

Au total, précisément 481 litres d'eau de déroulage de bouleau ont été traités sur colonne diaion HP-20 pour obtenir 180,5 grammes d'extrait brut (Tableau 2), correspondant à un rendement de 0,41 grammes d'extrait éthanolique enrichi par litre d'eau de déroulage de bouleau. Des variations de rendement minimales ont été observées entre les lots. Cette observation peut s'expliquer par une éventuelle variabilité dans la procédure de déroulage en fonction de la période de l'année. Par

exemple, il est possible que la teneur en certains composés varie d'une saison à une autre et soit donc différente en fonction de la période de récolte du bois. Une étude plus approfondie de la variation de la composition de l'eau de déroulage en fonction des sites et des saisons pourrait être effectuée par extraction en phase solide (SPE).

Tableau 2 : Résultats de production d'extrait brut

Lot	Volume traité (L)	Masse d'extrait (g)	Rendement (g/L)
1	114,5	51	0,45
2	104	48	0,46
3	262,5	81,5	0,31
Total	481	180,5	-
Moyenne	-	-	0,41 ± 0,08

L'extrait obtenu est une poudre amorphe brune à l'aspect brillant (Figure 6). Il s'agit d'un extrait enrichi en composés phénoliques et contenant d'autres molécules telles que des sucres non éliminés par le lavage à l'eau. La quantité de sucres restants dans l'extrait n'a pas été évaluée, il pourrait être intéressant d'effectuer cette évaluation afin de caractériser l'extrait au mieux.

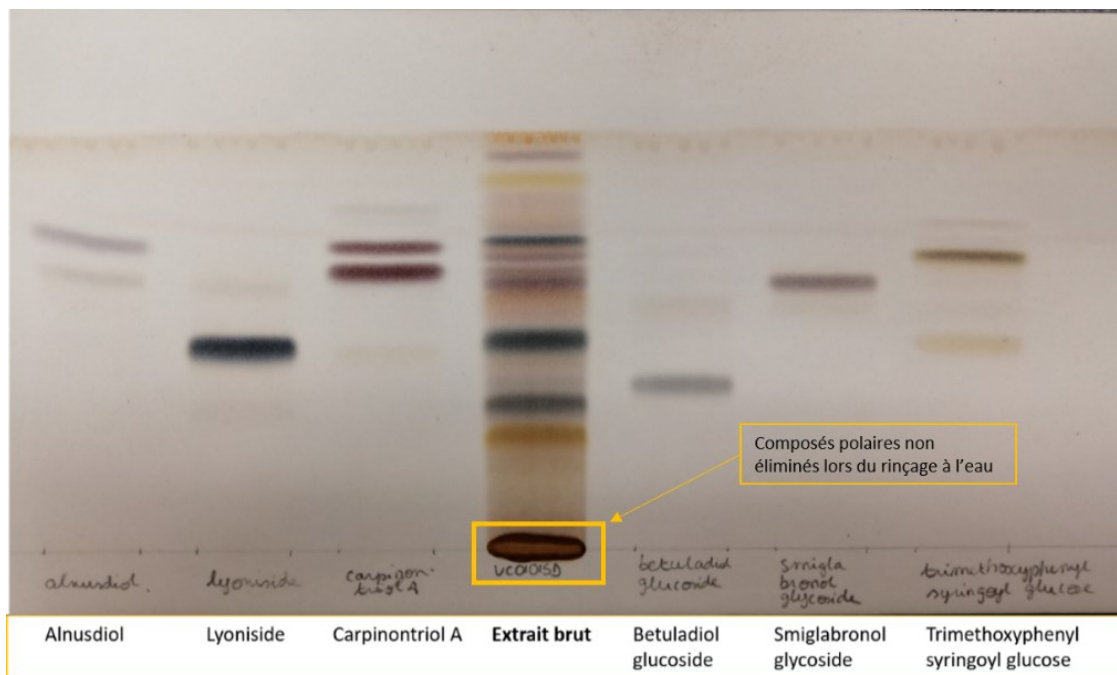


© Valentine Coicaud

Figure 6 : Extrait brut enrichi en composés phénoliques obtenu à partir de l'eau de déroulage de bouleau

Au cours des travaux de fractionnement, des analyses CCM ont été réalisées afin d'observer globalement la composition des fractions ainsi que leur pureté. Les extraits et fractions ont également été analysés par HPLC-MS dans le but d'étudier plus précisément leur composition. La même méthode d'analyse a été conservée pendant l'entièreté du projet afin de pouvoir comparer chaque fraction.

Une comparaison aux témoins isolés de l'extrait enrichi au méthanol lors des travaux préliminaires a été effectuée afin d'avoir une première idée sur la présence ou non de ces molécules dans l'extrait enrichi à l'éthanol. Le chromatogramme HPLC-MS est semblable à celui de l'extrait brut obtenu par extraction au méthanol lors des travaux préliminaires (Annexe 2). La comparaison en CCM et en HPLC-MS avec les témoins des molécules isolées lors des travaux préliminaires a montré que ceux-ci semblent se retrouver dans l'extrait enrichi à l'éthanol. En effet, parmi les six témoins disponibles testés, les pics de l'alnusdiol 10, du lyoniside 5, du carpinontriol A 2, du betuladiol glucoside 9 et du smiglabronol glycoside 4 ont été identifiés (Annexe 2). Seul un témoin, le triméthoxyphénylsyringoyl glucose, ne présente pas de pic suffisamment intense pour être identifié sur le chromatogramme HPLC. L'analyse CCM est moins précise, toutefois des taches aux mêmes rapports frontaux (Rf) que les témoins ont été observées dans l'extrait brut (Figure 7). Les taches observées sont principalement de couleur bleue, marron et mauve. Ces taches sont respectivement spécifiques aux lignanes, aux glycosides phénoliques et aux diarylheptanoïdes cycliques. Ces observations encouragent à utiliser l'éthanol en remplacement du méthanol étant donné que la composition de l'extrait brut reste similaire sans l'utilisation de solvant toxique. L'analyse CCM a également mis en évidence la présence de composés polaires au niveau de la ligne de dépôt (Figure 7). Cela permet d'affirmer que le rinçage à l'eau n'a pas éliminé la totalité des composés polaires au moment de l'extraction.



© Valentine Coicaud

Figure 7 : Analyse CCM de l'extrait brut et des témoins isolés précédemment (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H₂SO₄ 20% dans le méthanol)

Pour envisager l'utilisation de l'extrait enrichi dans des formulations cosmétiques, il est important que celui-ci ne présente pas de toxicité, en particulier sur les lignées cellulaires WS-1 (fibroblastes : cellules du derme) et HaCaT (kératinocytes : cellules de l'épiderme). En effet, aucune toxicité pour la peau ne doit être relevée pour employer l'extrait dans un produit cosmétique qui entrera en contact avec la peau. Aucune cytotoxicité n'a été relevée pour les extraits enrichis (IC₅₀ >200 µg/mL). De plus, les extraits démontrent une bonne activité antioxydante cellulaire et ORAC (Tableau 3). Ces résultats encouragent à utiliser l'extrait enrichi dans le domaine de la cosmétologie.

Les proportions en composés phénoliques varient entre 35 et 41 % massiques dans les extraits, ce qui montre que ces derniers sont effectivement enrichis en composés phénoliques.

Tableau 3 : Résultats des tests biologiques sur les extraits produits à partir des 3 lots d'eau de déroulage de bouleau

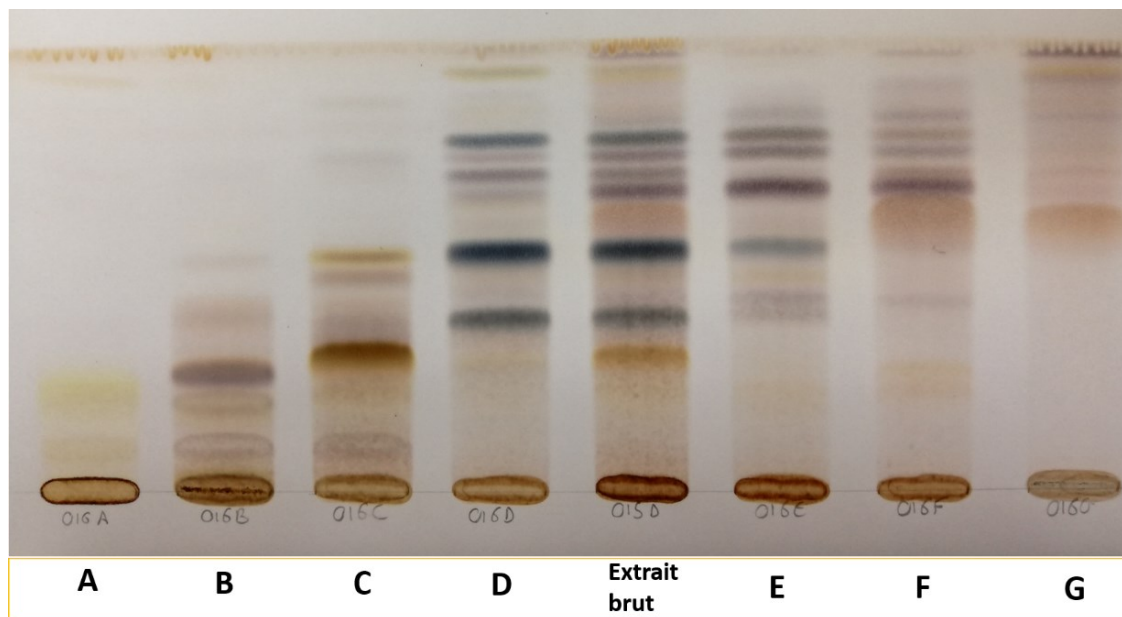
	ORAC (μmol Trolox/mg)	Antioxydant cellulaire (IC ₅₀ antioxydante μg/ml)	Folin-Ciocalteu (% (w/w))	Inhibition de NO (IC ₅₀ μg/ml)	Inhibition de NO (% inhibition à μg/ml)
Extrait brut lot 1	3,72 ± 0,75	0,30 ± 0,03	35 ± 5	120 ± 15	65 à 160
Extrait brut lot 2	6,7 ± 0,82	1,0 ± 0,3	37 ± 6	119 ± 11	67 à 160
Extrait brut lot 3	6,39 ± 1,09	0,26 ± 0,02	41 ± 5	>80	26 à 80
Quercetin	22,62 ± 4,06	0,16 ± 0,05	-	L-NAME 1 mM	75 ± 8

2.1.2. FRACTIONNEMENT

- **Fractionnement de l'extrait brut**

Afin d'identifier les molécules responsables de l'activité de l'extrait brut, un fractionnement de ce dernier a été engagé. Une masse de 31,5 grammes d'extrait brut a été séparée sur diaion HP-20 en 7 fractions pour un total de 29,9 grammes récupérés, représentant un rendement de 94,9 %. Cette première séparation a été effectuée avec un gradient de polarité décroissante, permettant d'obtenir des fractions de plus en plus riches en composés apolaires (haut de la plaque) (Figure 8).

Les fractions D, E et F présentent les activités antioxydantes cellulaires et ORAC les plus élevées avec des valeurs ORAC respectives de 6,79, 5,14 et 4,92 μmol Trolox/mg (Tableau 4). Ce sont aussi ceux qui présentent le pourcentage le plus élevé en composés phénoliques selon le test Folin-Ciocalteu avec des concentrations respectives de 50, 48 et 37 grammes de composés phénoliques pour 100 grammes d'extrait. Un lien hypothétique peut alors être établi entre l'activité antioxydante et la quantité de composés phénoliques dans les fractions⁷³. Selon les résultats obtenus, plus la fraction possède une quantité importante en composés phénoliques, plus son activité antioxydante est grande.



© Valentine Coicaud

Figure 8 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait brut sur colonne diaion HP-20 : fractions A à G (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H₂SO₄ 20% dans le méthanol)

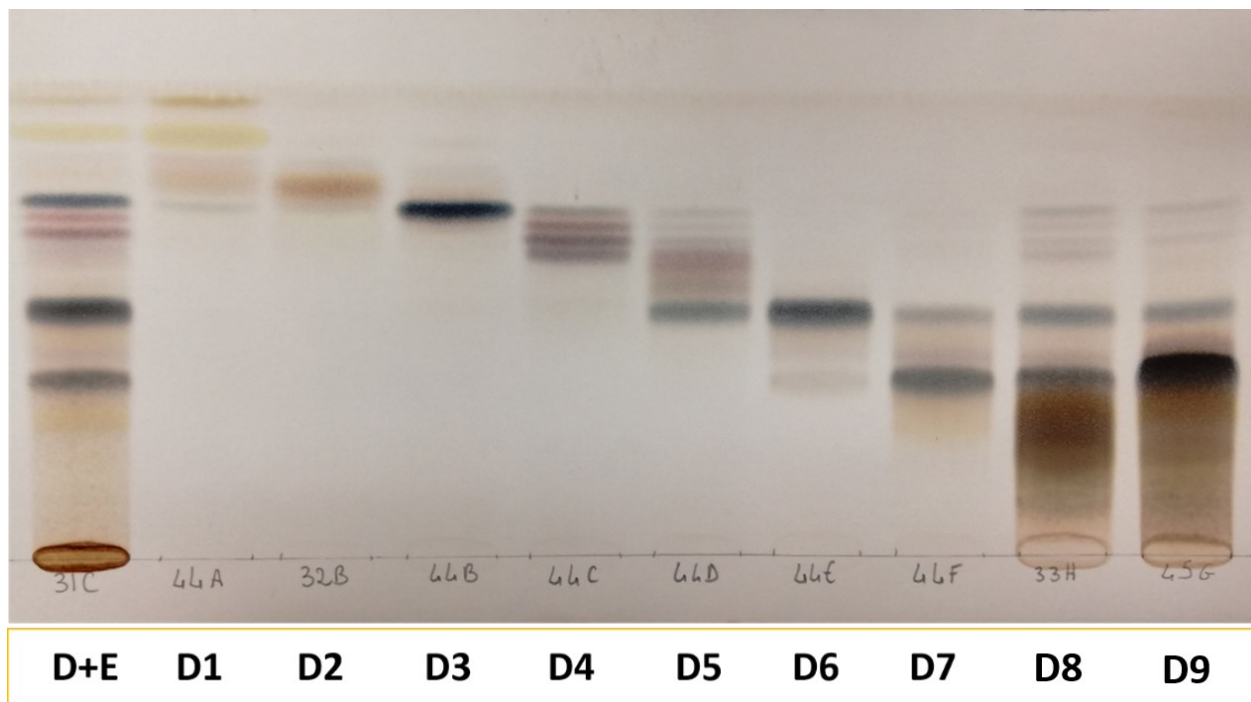
Tableau 4 : Résultats des tests biologiques des fractions A à G

	ORAC (μmol Trolox/mg)	Antioxydant cellulaire (IC ₅₀ antioxydante μg/ml)	Folin-Ciocalteu (% (w/w))	Inhibition de NO (IC ₅₀ μg/ml)	Inhibition de NO (% inhibition à μg/ml)
Fraction A	0,41 ± 0,10	10 ± 3	20 ± 3	>160	33 à 160
Fraction B	1,78 ± 0,39	1,0 ± 0,2	28 ± 5	>160	1 à 160
Fraction C	3,13 ± 0,40	4 ± 2	25 ± 5	>160	10 à 160
Fraction D	6,79 ± 0,98	0,4 ± 0,2	50 ± 8	117 ± 12	67 à 160
Fraction E	5,14 ± 1,15	0,6 ± 0,1	48 ± 8	>40	25 à 40
Fraction F	4,92 ± 0,96	0,32 ± 0,05	37 ± 6	>80	35 à 80
Fraction G	3,57 ± 0,57	1,1 ± 0,4	28 ± 5	45 ± 4	62 à 80
Extrait brut	6,39 ± 1,09	0,26 ± 0,02	41 ± 5	>80	26 à 80
Quercetin	22,62 ± 4,06	0,16 ± 0,05	-	L-NAME 1 mM	75 ± 8

La plupart des fractions sont inactives ou possèdent une faible activité anti-inflammatoire à l'exception des fractions D et G qui montrent une activité modérée avec un pourcentage d'inhibition de NO de 67% à 160 µg/ml et 62% à 80 µg/ml respectivement. Ces résultats suggèrent qu'il est plus intéressant de poursuivre le fractionnement bioguidé en se concentrant sur l'activité antioxydante.

- **Fractionnement des fractions D et E**

Aux vues de l'activité antioxydante particulièrement intéressante des fractions D et E, le choix du prochain fractionnement s'est tourné en priorité vers ces fractions. De plus, elles présentaient toutes les deux des masses conséquentes (4,6 g et 3,6 g) permettant d'envisager d'autres étapes de fractionnement. Les deux fractions ont aussi démontré une composition similaire selon les analyses CCM (Figure 8) et HPLC-MS, il a donc été choisi de les rassembler en une seule et même fraction D+E. Après le fractionnement, une masse totale de 6,23 g répartie en 9 fractions a été obtenue. Une grande partie de la fraction D+E traitée était constituée de composés très polaires qui ont été éliminés lors du rinçage de la colonne. Le fractionnement a été efficace et a permis d'obtenir des fractions D1 à D9 de polarité croissante. Ainsi, les fractions les plus apolaires ont été dépourvues des molécules polaires qui restaient sur la ligne de dépôt en CCM et qui se retrouvent désormais dans les rinçages (Figure 9).



© Valentine Coicaud

Figure 9 : Analyse CCM du fractionnement de D+E sur colonne de silice : fractions D1 à D9 (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H₂SO₄ 20% dans le méthanol)

La fraction D2 n'a pas été testée biologiquement afin de conserver sa faible masse pour un éventuel fractionnement subséquent.

Les activités ORAC des fractions testées sont particulièrement intéressantes, surtout pour les fractions D3 et D4 dont la valeur ORAC (respectivement 19 et 20 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) se rapproche de celle du témoin positif, la quercétine (27 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) (Tableau 5). La fraction D4 s'avère pro-oxydante à la plus haute concentration au test antioxydant cellulaire. Mise à part la fraction D1, aucune fraction ne semble posséder une activité anti-inflammatoire notable aux concentrations testées.

Dans l'esprit d'un fractionnement bioguidé, les fractions D3 et D4 ont été purifiées davantage afin d'identifier les molécules responsables de la forte activité ORAC observée. De plus, les fractions

D6 et D7 qui possédaient également une activité ORAC intéressante (respectivement 6,58 et 11 μmol Trolox/mg) ont aussi été fractionnées.

Tableau 5 : Résultats des tests biologiques des fractions D1 à D7

	ORAC (μmol Trolox/mg)	Antioxydant cellulaire (IC_{50} antioxydante $\mu\text{g/ml}$)	Folin- Ciocalteu (% (w/w))	Inhibition de NO (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)
Fraction D1	11 $\pm$ 1	0,133 $\pm$ 0,008	50 $\pm$ 4	16 $\pm$ 2
Fraction D3	19 $\pm$ 1	>75	90 $\pm$ 8	>15
Fraction D4	20 $\pm$ 2	pro-oxydant	59 $\pm$ 6	>120
Fraction D5	9,69 $\pm$ 0,85	>75	44 $\pm$ 11	>120
Fraction D6	6,58 $\pm$ 0,81	>75	69 $\pm$ 5	>120
Fraction D7	11 $\pm$ 1	>75	40 $\pm$ 5	>120
Fraction D8	3,62 $\pm$ 0,79	1,3 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 4	>120
Fraction D9	3,37 $\pm$ 0,59	0,31 $\pm$ 0,02	36 $\pm$ 7	>120
Quercetin	27 $\pm$ 4	0,038 $\pm$ 0,007	-	L-NAME 1 mM

○ Fractionnement de D3

Une séparation par chromatographie « flash » en phase inverse suivie d'une purification par HPLC préparative a conduit à l'obtention du composé majoritaire **16** ainsi que deux autres composés minoritaires **17** et **18**. Le spectre de masse ainsi que les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont permis de confirmer l'identité du (+)-lyonirésinol **16**. Les données sont en adéquation avec celles reportées dans la littérature⁷⁴. Plusieurs signaux ont confirmé la présence des différents groupes méthoxy (Annexe 5). Le singulet à 3,76 ppm intégrant pour 6 protons (H-7', H-8') a mis en évidence la présence de deux groupes méthoxy équivalents. Les singulets à 3,88 ppm (H-12) et 3,39 ppm (H-11) intégrant chacun pour 3 protons ont également permis de confirmer la présence de deux groupes méthoxy aux environnements chimiques différents sur la molécule. Le lyonirésinol **16** a déjà démontré des activités antimélanogéniques⁷⁵ et anti trichomoniasis⁷⁶ ainsi qu'inhibiteur de la mélanogénèse⁷⁷. Ce composé a déjà été isolé du *Vitex negundo* (*Verbenaceae*)⁷⁵. Il est plus abondant dans la nature sous sa forme

glycosidique, par exemple lié à un glucose (glucoside de lyoniresinol) ou un xylose (lyoniside, nudiposide). Les analyses ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC et HMBC des deux autres composés purs **17** et **18** n'ont pas permis de mener à leur identification. Il serait nécessaire de produire ces molécules en plus grande quantité afin d'effectuer des analyses supplémentaires pour établir leur structure.

- Fractionnement de D4

Une comparaison par HPLC-MS avec un témoin obtenu lors des travaux préliminaires a révélé la présence de carpinontriol A **2** dans la fraction D4 (Annexe 3). Après optimisation par CCM, une purification par chromatographie « flash » en phase inverse a permis d'obtenir le carpinontriol A **2** en quantité importante (196,9 mg). Son identité a par la suite été confirmée par les analyses RMN, dont les spectres ^1H et ^{13}C sont en adéquation avec la littérature⁷⁸ (Annexe 6). Les signaux protons entre 7,06 ppm et 6,56 ppm intégrant pour 6 protons au total ont permis d'affirmer que la molécule possédait 6 protons aromatiques (H-4, H-5, H-15, H-16, H-18, H-19). Cela a permis de vérifier la présence des deux cycles aromatiques tri-substitués. Le signal carbone à 218,6 ppm (C-11) a confirmé la présence du groupe carbonyle. Le carpinontriol A **2** est déjà connu pour son activité antioxydante (inhibition du radical ABTS⁺)⁷⁹. Il a déjà été isolé de plantes du genre *Carpinus* (*Betulaceae*) telles que *Carpinus cordata*⁸⁰ et *Carpinus turczanionwii*⁷⁹. La quantité disponible ainsi que la facilité d'isolation dans l'extrait font de ce composé un candidat intéressant pour la standardisation de l'extrait.

- Fractionnement de D6

Les analyses de la fraction D6 ont révélé que celle-ci contenait 4 composés principaux dont deux majoritaires (Annexe 4). De plus, en considérant la masse relativement importante de cette fraction (1,52 g), il a été décidé de chercher à isoler au moins les deux composés majoritaires dont une quantité intéressante était suspectée. La comparaison du chromatogramme HPLC-MS à ceux des

témoins obtenus lors des travaux préliminaires a permis de soupçonner que les deux composés majoritaires étaient le lyoniside 5 et le nudiposide 6 dont la structure est représentée à la Figure 10. Ceux-ci correspondent respectivement au (+) et au (-)-lyonirésinol lié chacun à un xylose. Ainsi, les aglycones des deux composés sont deux énantiomères, toutefois l'ajout du même sucre sur les deux énantiomères en fait des diastéréoisomères. L'optimisation sur colonne C₁₈ en HPLC analytique a montré que les deux diastéréoisomères ne se séparaient pas suffisamment pour obtenir des quantités intéressantes de chacun des deux composés purs (Figure 11). Ainsi, une séparation chirale a été envisagée. Une colonne composée de tris-(3,5-diméthylphényl) carbamoyl amylose a été utilisée. Un premier test a été effectué sur colonne chirale afin de déterminer si une séparation était observée. Ce test a montré une meilleure séparation du lyoniside 5 et du nudiposide 6 sur colonne chirale (Figure 12). Cette méthode a permis une séparation plus rapide et plus efficace des deux composés, ainsi que l'obtention d'une troisième molécule pure : le betulatétracol 3.

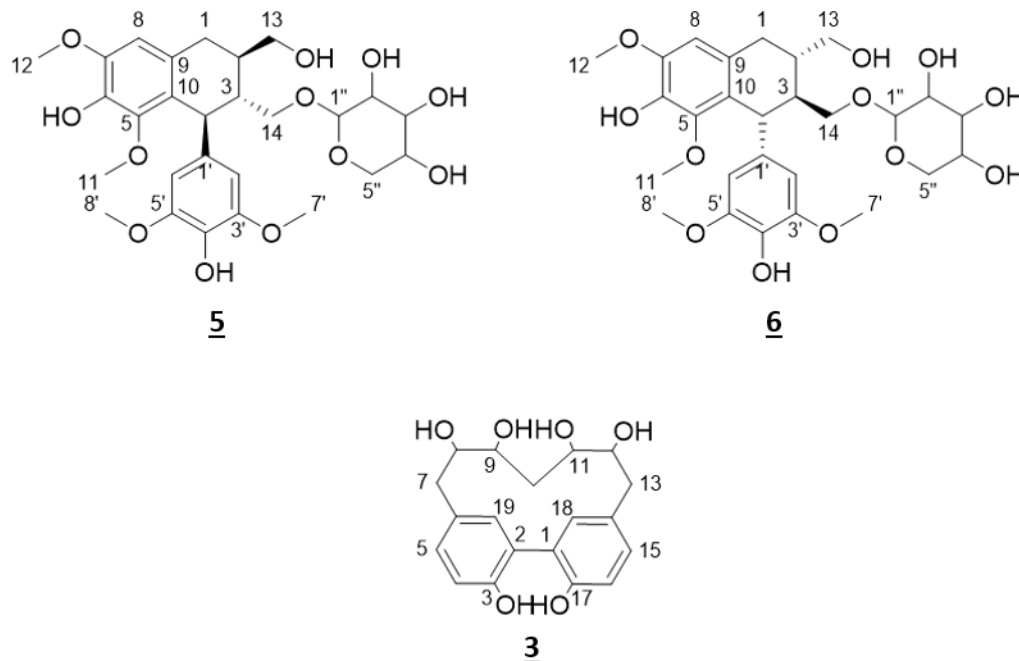


Figure 10 : Structure du lyoniside 5, du nudiposide 6 et du bétulatétracol 3

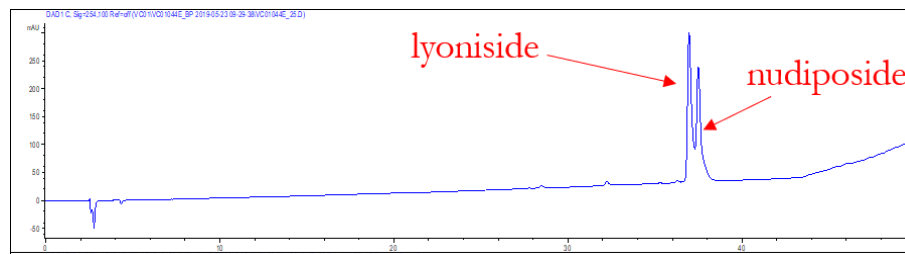


Figure 11 : Chromatogramme HPLC-MS du mélange lyoniside-nudiposide sur colonne C18

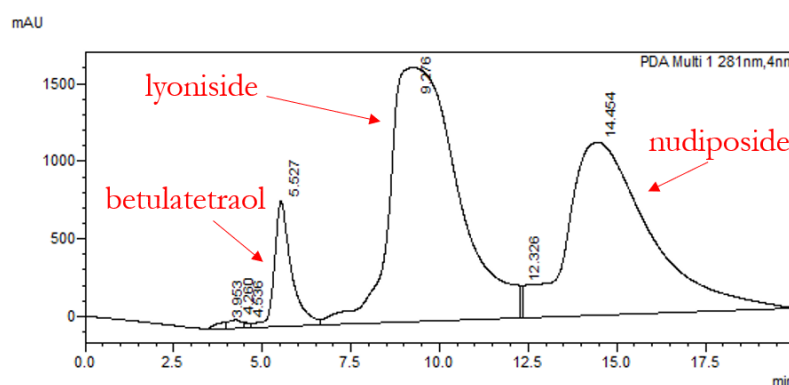


Figure 12 : Chromatogramme HPLC-préparative du mélange lyoniside-nudiposide sur colonne chirale Regispack 5 Micron

Les données RMN ^1H et ^{13}C sont en adéquation avec celles reportées dans la littérature pour les composés **5**^{81, 82}, **6**^{81, 82} et **3**⁸³. Les spectres proton et carbone du lyoniside **5** présentaient de nombreuses similitudes avec ceux du composé **16** (lyonirésinol). Toutefois, 5 carbones supplémentaires ont été observés sur la molécule, indiquant la présence d'un pentose (Annexe 7). Les signaux à 105,5 ppm (C-1'') et 4,18 ppm (H-1'') correspondant à la position anomérique ont confirmé la présence du sucre. Les déplacements chimiques proton et carbone du nudiposide **6** se sont révélés quasiment identiques à ceux du lyoniside **5**, indiquant qu'il s'agissait de la même configuration relative (Annexe 8). L'indice de rotation a permis de confirmer que le composé **6** ($[\alpha]_D - 60,550^\circ$ (MeOH ; c 0,434)) a une configuration absolue différente de celle du composé **5** ($[\alpha]_D + 38,235^\circ$ (MeOH ; c 0,442)) visible à la Figure 10. Ces indices de rotation sont conformes à ceux présentés dans la littérature⁸¹.

Le betulatétraol **3** lui, présente un spectre proton caractéristique des diarylheptanoïdes cycliques (Annexe 9). Tout comme pour le composé **2**, les signaux entre 7,04 ppm et 6,81 ppm ont permis de confirmer la présence des 6 protons aromatiques (H-4, H-5, H-15, H-16, H-18, H-19). L'intensité des signaux du spectre carbone a mis en évidence la symétrie de la molécule visible à la Figure 10. En effet, chaque signal correspond à deux carbones équivalents, excepté pour le signal à 42,1 ppm beaucoup moins intense que les autres, qui correspond à un seul carbone (C-10).

Le lyoniside **5** et le nudiposide **6** ont tous les deux déjà été identifiés dans plusieurs familles de plantes incluant les *Betulaceae* (*Betula pendula*)⁸² ou les *Lauraceae* (*Lindera glauca*)⁸⁴. Le lyoniside **5** semble être un peu plus abondant dans la nature que le nudiposide^{85, 86}. Ils présentent tous les deux une cytotoxicité contre les cellules A498 (cellules épithéliales rénales cancéreuses)⁸⁴. Plusieurs études ont montré que le lyoniside possède aussi une activité antioxydante DPPH, allélopathique et antifongique⁸⁵.

Le betulatétraol **3**, comme son nom l'indique, a été isolé de plantes de la famille des *Betulaceae* : *Betula platyphylla*⁸³, *Ostryopsis nobilis*⁸⁷ et *Alnus japonica*⁸⁸. Une étude suggère qu'il possède une activité anti-adipogénique⁸⁸, mais le potentiel biologique de ce composé reste à ce jour très peu connu.

○ Fractionnement de D7

La fraction D7 a été sélectionnée pour une poursuite de fractionnement afin d'identifier les molécules responsables de son activité ORAC intéressante (11 µmol Trolox/mg, Tableau 5).

Les analyses HPLC-MS ont révélé que le composé majoritaire de la fraction D7 se trouvait dans la fraction D7A. Ainsi, la fraction D7A a été purifiée afin d'isoler ce composé majoritaire. Après comparaison aux témoins obtenus lors des travaux préliminaires, le composé a été identifié comme étant le glucoside de lyonirésinol **7**. Après isolation, son identité a été confirmée par analyse RMN par comparaison à la littérature^{89, 90}. Les spectres proton et carbone présentaient de nombreuses similitudes avec ceux du composé **16** (lyonirésinol). Toutefois, 6 signaux carbone supplémentaires

ainsi que des signaux protons autour de 3 ppm ont montré la présence d'un glucose (Annexe 10). Les signaux à 104,8 ppm (C-1'') et 4,30 ppm (H-1'') correspondant à la position anomérique ont confirmé que la molécule était bien liée à un sucre. Le glucoside de lyonirésinol **7** a déjà été isolé de plusieurs écorces et racines d'arbres tels que le *Betula pendula* (*Betulaceae*)⁹¹, le *Quercus petraea* (*Fagaceae*)⁹² ou l'*Annona squamosa* (*Annonaceae*)⁹⁰. Le composé a montré des activités antimicrobienne⁹³, antioxydante DPPH⁹⁴ et inhibitrice de la mélanogénèse⁷⁷. Un second composé pur a été obtenu. Après analyse RMN, il s'est avéré que ce composé était le composé **5** précédemment isolé de la fraction D6. Le chromatogramme HPLC-MS de la fraction D7C a montré la présence d'un composé majoritaire. La purification par HPLC préparative a finalement permis d'isoler les composés **19** et **20**. L'élucidation de la structure de ces deux composés a été possible grâce aux analyses RMN ¹H, ¹³C, DEPT-135, COSY, HSQC et HMBC (Annexe 11 et Annexe 12). Le spectre ¹H du composé **19** présentait un singulet à 3,61 ppm (H-7, H-9) intégrant pour 6 protons associés à deux carbones équivalents à 57,2 ppm (C-7, C-9) par HSQC, a indiqué la présence de deux groupes méthoxy équivalents (Tableau 6). Les corrélations HMBC entre 3,61 ppm (H-7, H-9) et 155,5 ppm (C-3, C-5) ont montré que ces groupes méthoxy sont présents en positions 3 et 5 du premier cycle aromatique (Figure 13).

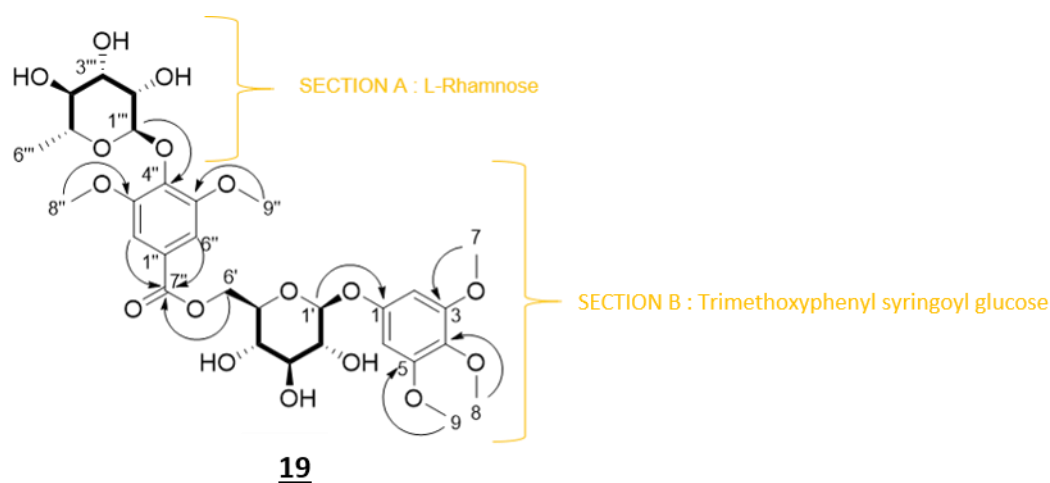


Figure 13 : Structure de **19** identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.

Le signal à 6,37 ppm (H-2, H-6), intégrant pour deux protons associés à deux carbones équivalents à 97,1 ppm (C-2, C-6) par HSQC, a indiqué une symétrie sur le cycle aromatique. Enfin, le signal à 3,66 ppm intégrant pour 3 protons a indiqué la présence d'un troisième groupe méthoxy, associé par HMBC à la position 4 grâce à la corrélation entre 3,66 ppm (H-8) et 133,52 (C-4). Toutes ces informations ont ainsi révélé la présence d'un premier cycle aromatique 1,3,4,5-tétrasubstitué.

*Tableau 6 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplages pour chaque position du composé **19***

Position	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm) (multiplicité, J (Hz))
1	156,3	-
2 6	97,1	6,37 (s)
3 5	155,5	-
4	133,5	-
7 9	57,2	3,61 (s)
8	62,0	3,66 (s)
1''	127,7	-
2'' 6''	108,5	7,32 (s)
3'' 5''	155,4	-
4''	140,8	-
7''	168,1	-
8'' 9''	57,4	3,83 (s)
1'	103,5	4,88 (d, 7,5)
2'	74,5	3,45 (m)
3'	78,3	3,51 (m)
4'	73,0	3,41 (m)
5'	76,5	3,79 (s)
6'	66,4	4,78 (m)
1'''	104,4	5,37 (s)
2'''	73,0	4,13 (s)
3'''	72,8	3,90 (dd, 9,5, 3,3)
4'''	75,5	3,47 (m)
5'''	72,2	4,26 (dd, 9,8, 6,6)
6'''	18,6	1,23 (d, 6,2)

La corrélation HMBC entre 4,88 ppm (H-1') et 156,3 ppm (C-1) a montré le lien entre le cycle aromatique en C-1 et le glucose. Le spectre COSY a permis de relier les protons H-1' à H-5'. La présence de deux groupes méthoxy équivalents en positions 3'' et 5'' et de deux protons équivalents

en positions 2'' et 6'' a été démontrée grâce à un raisonnement similaire à celui effectué pour le premier cycle aromatique 1,3,4,5-tétrasubstitué. Le signal à 168,1 ppm (C-7'') sur le spectre ^{13}C a indiqué la présence d'un ester. La corrélation HMBC entre 7,32 ppm (H-2'' ; H-6'') et 168,1 ppm (C-7'') a permis de positionner l'ester en position 1'' du cycle aromatique. Une seconde corrélation HMBC entre 4,80 ppm (H-6') et 168,1 ppm (C-7'') a indiqué la liaison entre l'ester et le glucose.

La présence d'un second sucre a été relevée grâce aux signaux de sucre supplémentaires entre 3,38 et 3,54 ppm. L'absence d'un second signal CH_2 en DEPT-135 indique que ce sucre en est dépourvu. De plus, le signal proton à 1,23 ppm intégrant pour 3 protons montre que le sucre possède un CH_3 caractéristique d'un rhamnose. La corrélation HMBC entre 5,37 ppm (H-1''') et 140,84 ppm (C-4'') a permis de positionner le sucre en position 4''. Enfin, les corrélations COSY ont permis de relier les protons H-1''' à H-6''' comme montré à la Figure 13.

La structure du composé **19** n'a jamais été rapportée dans la littérature. Il s'agit en fait du triméthoxyphényl syringoyl glucose **11** (section B sur la Figure 13), isolé lors des travaux préliminaires, lié à un rhamnose (section A sur la Figure 13). Le triméthoxyphényl syringoyl glucose **11**, lui, a déjà été isolé du *Betula pendula*⁹¹.

Le spectre ^1H du composé **20** présentait quant-à-lui des signaux correspondant à deux cycles aromatiques 1,4-disubstitués (Annexe 12). Les doublets à 7,05 et 7,02 ppm intégrant chacun pour deux protons associés par HSQC à deux carbones équivalents pour chaque doublet (respectivement 130,3 ppm et 130,4 ppm) ont confirmé la présence de deux cycles aromatiques présentant chacun une symétrie. La corrélation COSY entre les signaux à 7,05 ppm et 6,70 ppm a permis de relier les protons H-2' et H-3' ainsi que H-6' et H-5' sur le premier cycle aromatique. De la même manière, la corrélation COSY entre les signaux à 7,02 ppm et 6,70 ppm a permis de relier les protons H-2'' et H-3'' ainsi que H-6'' et H-5''.

Le spectre DEPT135 a présenté six CH_2 indiquant la présence d'une chaîne alkyle entre les deux cycles aromatiques. Le signal HMBC entre le multiplet à 2,72-2,51 ppm (H-7) et le signal carbone à 134,7 ppm (C-1') a permis de lier le premier cycle aromatique à la chaîne. Il en va de

même pour le second cycle aromatique qui a été lié à l'autre extrémité de la chaîne grâce à une corrélation HMBC entre 2,72-2,51 ppm (H-1) et 134,6 ppm (C-1''). Les protons H-1 à H-6 ont quant à eux été reliés grâce au spectre COSY.

La corrélation HSQC entre 4,41 ppm et 104,3 ppm, correspondant à une position anomérique, a indiqué la présence d'un sucre. La corrélation HMBC entre 4,41 ppm (H-1''') et 78,4 ppm (C-5) a permis de placer ce sucre en position C-5 sur la chaîne. Le spectre COSY a permis de relier les protons H-1''' à H-6''' du sucre montrant qu'il s'agit d'un glucose comme le montre la Figure 14.

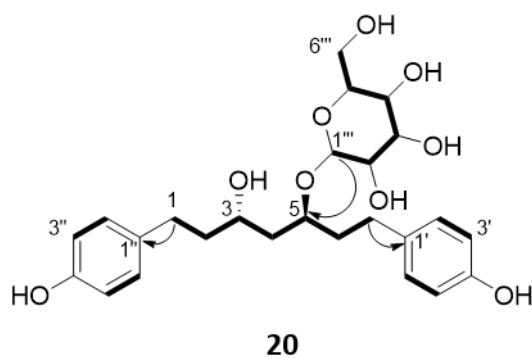
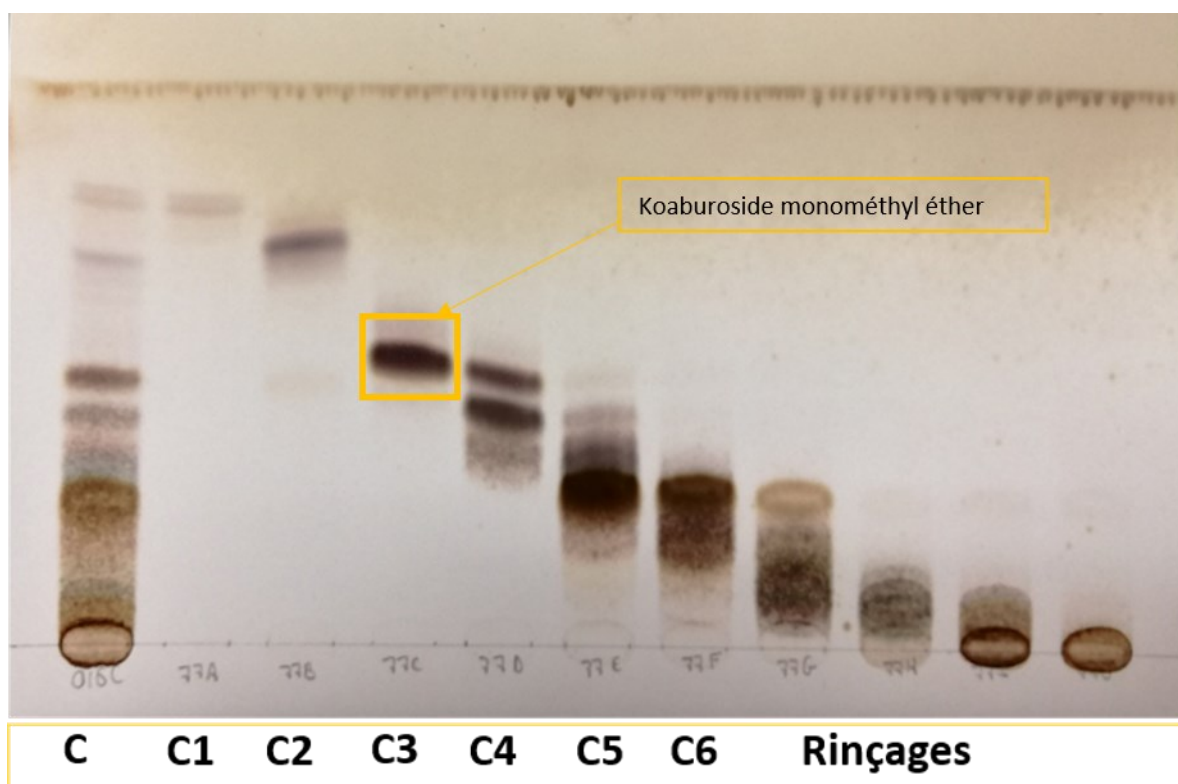


Figure 14 : structure de **20** identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.

La structure de **20** correspond ainsi à celle de l'hannokinol avec un glucose en position 5. Les données RMN ^1H et ^{13}C de **20** correspondent à celles reportées dans la littérature⁹¹. Le composé a déjà été isolé du *Betula pendula*⁹¹, du *Betula platyphylla*⁹⁵ et du *Tacca chantrieri*⁶². La détermination de la configuration absolue de ce composé n'a jamais été présentée dans la littérature, il serait donc nécessaire de vérifier la configuration absolue de la molécule. La littérature a mis en lumière une activité antioxydante obtenue avec la méthode TBA, qui correspond à la quantification des TBA (Thiobarbituric Acid) dont la quantité est liée à l'état d'oxydation des échantillons^{95, 96}.

- **Fractionnement de la fraction C**

La décision de fractionner davantage la fraction C a été prise à la lumière des analyses CCM et HPLC-MS. La fraction présentait en effet un composé majoritaire ainsi que d'autres composés présents en quantité intéressante (Figure 8). De plus, la masse de C était suffisante pour effectuer un nouveau fractionnement (3,942 g). Une masse totale de 1,374 g répartie en 7 fractions a été récupérée, ce qui signifie que peu de pertes ont eu lieu durant ce fractionnement par rapport à la masse investie (1,444 g). Ce fractionnement a permis l'obtention de fractions de plus en plus enrichies en composés polaires comme illustré à la Figure 15. Il a permis d'accéder directement à une première molécule pure, le koaburoside monométhyl éther **21** (fraction C3).



© Valentine Coicaud

Figure 15 : Analyse CCM du fractionnement de C sur colonne de silice : fractions C1 à C6 (milieu d'élution : chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V), révélation : H₂SO₄ 20% dans le méthanol)

L'élucidation structurale de **21** a été possible grâce aux analyses RMN ^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, HSQC et HMBC (Annexe 13). Comme le montre le Tableau 7, le composé **21** présentait le profil d'un cycle aromatique 1,3,4,5-tétrasubstitué comme observé avec le composé **19**.

Tableau 7 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplages pour chaque position du composé **21**

Position	^{13}C (ppm)	^1H (ppm) (multiplicité, J (Hz))
1	156,1	-
2	96,0	6,49 (s)
6		
3	154,8	-
5		
4	134,3	-
7	56,5	3,81 (s)
9		
8	61,2	3,70 (s)
1'	103,2	4,81 (d, 7,4)
2'	74,9	3,45 (m)
3'	78,0	3,47 (m)
4'	71,7	3,35 (s)
5'	78,4	3,43 (m)
6'a	62,7	3,92 (dd, 12,0, 2,1)
6'b		3,65 (m)

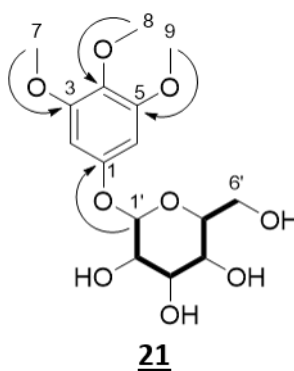


Figure 16 : structure de **21** identifiée avec les corrélations 2D ayant permis l'identification. Les flèches représentent les corrélations HMBC et les liaisons en gras les corrélations COSY.

Tout d'abord, le singulet à 3,81 ppm intégrant pour 6 protons associés à deux carbones équivalents (56,5 ppm) par HSQC a indiqué la présence de deux groupes méthoxy équivalents. Les corrélations HMBC entre 3,81 ppm (H-7, H-9) et 154,8 ppm (C-3, C-5) ont montré que ces groupes méthoxy sont présents en positions 3 et 5 du cycle aromatique (Figure 16). Le signal à 6,49 ppm, intégrant pour deux protons associés à deux carbones équivalents (96,0 ppm) par HSQC, a indiqué une symétrie sur le cycle aromatique. Enfin, le signal à 3,70 ppm intégrant pour 3 protons a indiqué la présence d'un troisième groupe méthoxy, associé par HMBC à la position 4 grâce à la corrélation entre 3,70 ppm (H-8) et 134,3 (C-4).

La corrélation HSQC entre le proton à 4,81 ppm et le carbone à 103,2 ppm correspondant à une position anomérique a indiqué la présence d'un sucre. La corrélation HMBC entre 4,81 (H-1') et 156,1 (C-1) a confirmé que le sucre était bien lié en position 1 du cycle aromatique. Le spectre COSY a ensuite permis de corréler les protons H-1' à H-6' du glucose.

Le composé **21** est très peu présent dans la littérature, par conséquent les données n'ont pas pu être comparées à d'autres. Toutefois, quelques articles de la littérature asiatique font allusion à cette molécule et les données IR concordent avec la littérature⁹⁷. Il s'agit de la première isolation du koaburaside monométhyl éther dans la famille des *Betulaceae*. Le composé a été isolé de cinq plantes provenant principalement d'Asie, telles que *Glochidion eriocarpum*⁹⁸ ou *Excoecaria agallocha*⁹⁹. Aucune activité biologique n'a été rapportée jusqu'à maintenant dans la littérature.

○ Fractionnement de C5

Une purification par HPLC préparative de la fraction C5 a permis de résoudre le composé **7** et d'isoler le composé majoritaire de la fraction C : le kelampayoside A **1**. Les données RMN ¹H et ¹³C sont en adéquation avec celles reportées dans la littérature^{100, 101}. La présence de deux groupes méthoxy équivalents a été confirmée par le singulet à 3,82 ppm (H-7, H-9) intégrant pour 6 protons (Annexe 14). Le troisième groupe méthoxy a été confirmé par le signal à 3,71 ppm (H-8). Le signal à 6,46 ppm (H-2, H-6) intégrant pour deux protons a montré que seulement deux protons aromatiques

étaient présents sur la molécule, montrant que le cycle était tétra-substitué. Malgré son identification dans plusieurs écorces d'arbres principalement de la famille des *Rubiaceae*, aucune activité biologique notable n'a été publiée¹⁰¹⁻¹⁰³.

2.2. BILAN DU FRACTIONNEMENT

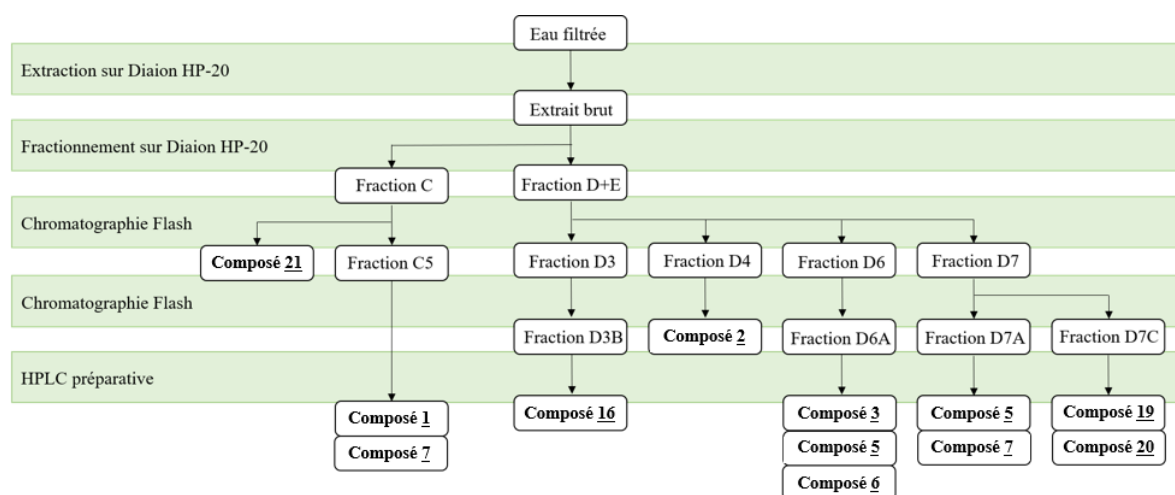


Figure 17 : Schéma de fractionnement pour obtenir les composés purs à partir de l'eau de déroulage de bouleau

Les travaux de fractionnement représentés à la Figure 17 ont permis d'isoler 12 molécules pures. Parmi elles, 10 ont été identifiées formellement (illustrés à la Figure 18) et deux restent encore inconnues par manque de masse pour les analyses (composés 17 et 18). Parmi les 10 molécules identifiées, 4 n'avaient pas encore été isolées lors des travaux préliminaires : le lyonirosinol 16, le rhamnoside de trimethoxyphenyl syringoyl glucose 19, le glucoside d'hannokinol 20 et le koaburaside monomethyl ether 21. L'existence du composé 19 n'a jamais été rapportée dans la littérature, le composé 20 mérite d'être étudié concernant sa configuration absolue, et le composé 21 n'avait jamais été isolé de la famille des *Betulaceae* auparavant. L'isolation et l'identification de ces composés sont peu communes et indiquent que l'eau de déroulage est une matrice originale et intéressante d'un point de vue scientifique. Parmi les composés isolés, le carpinontriol A 2 et le kelampayoside A 1

représentent de bons candidats pour la standardisation de l'extrait brut puisqu'ils sont présents en quantité importante dans l'extrait et facilement identifiables par HPLC-MS.

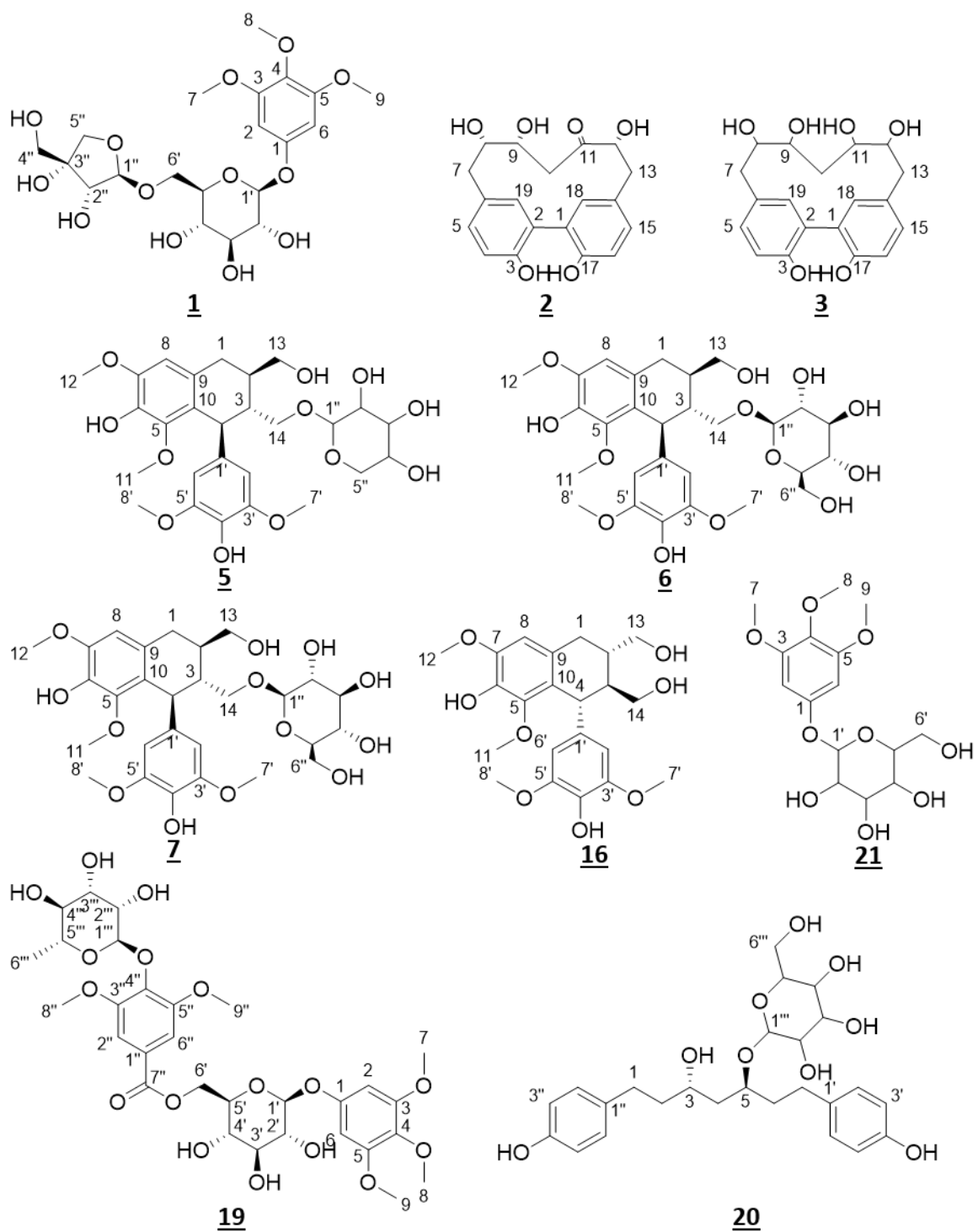


Figure 18 : Structure des composés isolés de l'eau de déroulage de bouleau

2.2.1. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité biologique des composés purs qui ont été isolés en quantité suffisante a pu être évaluée. Les résultats des activités antioxydantes cellulaires et ORAC sont présentés dans le Tableau 8. Il s'agit de la moyenne des résultats de deux expériences indépendantes pour lesquelles l'activité biologique a été évaluée en triplicata. Les données montrent que la majorité des molécules testées possèdent une activité ORAC importante, variant entre 10 et 29 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. Ces valeurs expliquent l'activité ORAC intéressante de l'extrait brut.

Tableau 8 : Activités antioxydantes cellulaires et ORAC des composés purs isolés en quantité suffisante pour tests biologiques

Composé	Nom	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol}$)	Antioxydant cellulaire (IC ₅₀ antioxydante $\mu\text{g/ml}$)
16	Lyonirésinol	15 $\pm$ 2	6,8 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,6
2	Carpinontriol A	29 $\pm$ 8	10 $\pm$ 3	>50
5	Lyoniside	10 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	>50
6	Nudiposide	10 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
3	Betulatétraol	18,6 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 0,1	>10
7	Glucoside de Lyonirésinol	10,1 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,2	1,60 $\pm$ 0,04
20	Glucoside d'hannokinol	22,3 $\pm$ 0,3	10,7 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,3
21	Koaburaside monométhyl éther	0,18 $\pm$ 0,01	0,0610 $\pm$ 0,0004	3,8 $\pm$ 0,7
1	Kelampayoside A	0,008 $\pm$ 0,003	0,004 $\pm$ 0,002	Non testé
	Extrait brut	7,8 $\pm$ 0,7	Pas de valeur	0,19 $\pm$ 0,01
	Trolox	3,87 $\pm$ 0,01	0,969 $\pm$ 0,003	0,035 $\pm$ 0,003
	Quercétine	23 $\pm$ 2	7,6 $\pm$ 0,6	0,120 $\pm$ 0,005

La valeur la plus élevée est celle du carpinontriol A **2** avec 29 $\pm$ 8 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, qui dépasse même celle de la quercétine (témoin positif). Une activité antioxydante au test DPPH avait déjà été rapportée dans *Carpinus turczaninowii*¹⁰⁴.

Le glucoside d'hannokinol **20** est le composé testé qui possède le plus grand potentiel antioxydant. En effet, sa valeur ORAC de 22,3 $\pm$ 0,3 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ est semblable à celle de la quercétine. De plus, ses résultats au test cellulaire donnent une IC₅₀ intéressante de 2,2 $\pm$ 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats confirment l'activité antioxydante obtenue avec la méthode TBA qui a été rapportée

dans la littérature^{95, 96}. De plus, ils complètent le peu d'informations publiées dans la littérature sur ce composé.

Cinq autres molécules isolées de l'eau de déroulage présentent une activité ORAC notable : le lyonirésinol **16**, le lyoniside **5**, le nudiposide **6**, le betulatétraol **3** et le glucoside de lyonirésinol **7**. Parmi elles, celle du betulatétraol **3** est particulièrement élevée. Aucune activité antioxydante ne lui avait été découverte jusqu'à aujourd'hui.

Il est intéressant de constater que les deux diarylheptanoïdes cycliques testés (carpinontriol A **2** et betulatétraol **3**) possèdent une excellente activité ORAC et pas d'IC₅₀ notable au test cellulaire. En effet, les deux tests n'évaluent pas le même potentiel antioxydant : le test ORAC est un test chimique qui caractérise la capacité d'un échantillon à neutraliser les radicaux peroxy, tandis que le test cellulaire évalue la capacité des composés à empêcher l'oxydation à l'intérieur des cellules (fibroblastes). Ainsi, un composé peut présenter un excellent potentiel ORAC et un potentiel antioxydant cellulaire plus faible. Le glucoside d'hannokinol **20** qui, lui, est linéaire et lié à un glucose, possède aussi une excellente activité ORAC mais aussi un bon IC₅₀ au test cellulaire. Il serait intéressant de tester l'activité ORAC d'autres diarylheptanoïdes cycliques et glycosides de diarylheptanoïdes afin d'établir une relation structure-activité antioxydante de ce type de composé.

Le composé qui ne possède pas de liaison glycosidique (lyonirésinol **16**) est celui qui présente la meilleure activité ORAC et antioxydante cellulaire parmi les quatre lignanes testés (lyonirésinol **16**, lyoniside **5**, nudiposide **6**, glucoside de lyonirésinol **7**). Aucune activité antioxydante n'a déjà été relatée pour le lyonirésinol **16** contrairement au lyoniside **5** et au glucoside de lyonirésinol **7** qui ont déjà montré des résultats antioxydants avec le test DPPH^{85, 94}. Les quatre lignanes possèdent une activité ORAC intéressante.

Pour finir, le koaburaside monométhyl éther **21** dont aucune activité biologique n'a été citée dans la littérature, montre une faible valeur ORAC et une activité antioxydante modérée sur modèle cellulaire.

2.2.2. AUTRES ACTIVITÉS TESTÉES

Ni l'extrait ni les molécules testées ne présentent de cytotoxicité sur les kératinocytes et les fibroblastes, il est donc possible de les utiliser pour des formulations cosmétiques. En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, aucune molécule n'a présenté de résultat intéressant, mis à part l'extrait brut qui a montré une inhibition de NO de 49% à 160 µg/mL. Cette activité peut être mise en avant en complément de son activité antioxydante marquée.

Pour résumer, au moins sept molécules isolées de l'eau de déroulage ont un réel potentiel antioxydant. Le glucoside d'hannokinol ou le lyonirésinol pourraient être considérés comme des bons candidats pour des tests de formulation cosmétique. Toutefois, plusieurs paramètres doivent être pris en compte. Tout d'abord, l'IC₅₀ de l'extrait brut est plus intéressante pour le test cellulaire (plus important pour une utilisation cosmétique). L'extrait brut est également le seul à posséder une activité anti-inflammatoire notable. De plus, l'accès aux molécules est plus difficile à mettre en œuvre et plus long/dispensieux que l'obtention de l'extrait brut. Ainsi, l'utilisation de l'extrait brut comme actif cosmétique reste le meilleur compromis entre une bonne activité et une méthode d'obtention accessible. C'est pour ces raisons que l'extrait brut a été fourni au laboratoire Boréaderme pour des tests de formulation cosmétique qui ont mené à la création d'une première gamme cosmétique désormais commercialisée : la gamme Betula, dont l'actif est l'extrait brut d'eau de déroulage de bouleau.

CHAPITRE 3
MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. ASPECT GÉNÉRAL POUR LES EXTRACTIONS, PURIFICATIONS ET ANALYSES

3.1.1. ANALYSES

Les plaques CCM sont des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (avec indicateur F_{254}) ou RP-18 (avec indicateur F_{254}) fournies par Merck (Allemagne). Sauf indication contraire, les CCM ont été éluées dans un gradient chloroforme/méthanol/eau 50 : 15 : 1 (V : V : V) et révélées avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 20% dans le méthanol puis chauffées à 120 °C pendant 5 minutes. Six molécules isolées lors des travaux préliminaires étaient disponibles au laboratoire : alnusdiol 10, lyoniside 5, carpinontriol A 2, bétuladiol glucoside 9, smiglabronol glucoside 8 et triméthoxyphénylsyringoyl glucose 11. Ces molécules ont été utilisées comme témoins pour les analyses CCM.

Les extraits et fractions ont été analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance équipée d'un détecteur à barrettes de diode (DAD) (HPLC Agilent 1100, module de dégazage et d'injection Agilent 1200) couplée à un Spectromètre de Masse (Agilent série G1956B, ionisation par électrospray). Les analyses ont été effectuées sur une colonne biphenyle Kinetex 5 μm (100 Å, 250 x 4,6 mm) de la marque Phenomenex. Les échantillons préalablement filtrés à 0,45 μm ont été injectés en quantité de 10 μL à un débit de 1 mL/min suivant les mêmes conditions (Tableau 9) pour permettre une comparaison entre les échantillons.

Tableau 9 : Conditions d'analyse HPLC des échantillons sur colonne biphenyle

Solvants	
A: H_2O + 0,1 % $HCOOH$	
B: MeOH	
Gradient	Temps
10 $\rightarrow$ 50% B	40 min
50 $\rightarrow$ 100% B	50 min
100 % B	60 min

La mesure des indices de rotation a été effectuée sur un polarimètre automatique Autopol IV de la marque Rudolph Research Analytical. Les spectres UV ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à réseau de diode Agilent 8453, et les spectres FTIR ont été acquis avec un Agilent Cary 630. Les spectres RMN ^1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) et ^2D (^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC) ont été acquis sur un spectromètre Bruker 400 (400 MHz pour les spectres ^1H et 100 MHz pour les spectres ^{13}C). Toutes les molécules analysées par RMN ont été dissoutes dans du méthanol deutéré (CD_3OD) et les déplacements chimiques ont été présentés en ppm (δ) relatifs aux pics du solvant (δ_{H} 3,31 ppm et δ_{C} 49,0 ppm).

3.1.2. TRAVAUX D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

Tout d'abord, la production d'extrait brut a été effectuée sur résine diaion HP-20 fournie par VWR (Canada). Les premières étapes de fractionnement ont été effectuées sur chromatographie liquide à basse pression (système Büchi Sepacore) munie d'un détecteur UV et d'un collecteur de fraction. La longueur d'onde de détection pour visualiser la séparation des pics d'une manière optimale a été fixée à 254 nm pour toutes les fractions. Pour les séparations en phase inverse, la phase stationnaire utilisée était une cartouche C18 SiliaSep de 40 grammes (ref. FLH-R3323OB-ISO40) du fournisseur Silicycle (Canada). Pour les séparations en phase normale, une colonne Büchi Borosilikat 3.3 (ref. n°17981, hauteur 46 cm, diamètre 4 cm) a été utilisée. Celle-ci était remplie d'environ 350 grammes de silice ZEOprep 60 HYD/40-63 μm fournie par Zeochem (É.-U.). Lorsque nécessaire, l'échantillon à fractionner était déposé sur la colonne sous forme de « dry pack ». Pour cela, la masse sèche d'échantillon était dissoute dans un minimum de méthanol puis évaporée à l'évaporateur rotatif avec de la silice. La poudre obtenue était ensuite déposée sur la colonne.

Après optimisation de la méthode de séparation d'une fraction sur HPLC analytique, les séparations et purifications finales ont été effectuées sur HPLC préparative (Agilent 1100) avec un détecteur (UV/DAD) à longueur d'onde multiple et un collecteur de fractions. La colonne utilisée était une colonne C18 Kinetex 5 μm (100 Å, 250 x 21,2 mm) de la marque Phenomenex. Dans un cas

particulier, une colonne chirale Regispack 5 Micron (250 x 10 mm) de la marque Regis (É.-U.) a été utilisée. Tous les échantillons traités en HPLC préparative ont été dissous à une concentration de 80 mg/mL dans du DMSO. Le volume injecté a varié entre 100 et 150 µL selon les fractions. Le débit de la phase mobile était de 20 mL/min pour la colonne C18 et 4 mL/min pour la colonne chirale.

Les solvants employés pour les extractions et les premiers travaux de fractionnement étaient de grade ACS. Pour les analyses HPLC ainsi que la séparation en HPLC préparative, les solvants utilisés étaient de grade HPLC. Tous les solvants ont été fournis par Fisher Scientific (Canada).

Les solvants ont été évaporés à sec à l'aide d'évaporateurs rotatifs de la marque Büchi puis du lyophilisateur de Labconco (É.-U.).

3.2. ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EAU DE DÉROULAGE DE BOULEAU

3.2.1. EXTRACTION

- **Matériel végétal**

L'eau de déroulage de bouleau a été directement fournie par l'entreprise Industries John Lewis. Elle a été conservée au congélateur dans des bidons de 20 L. Au total, 481 litres d'eau de déroulage directement venue de l'entreprise IJL ont été traités. Ces lots correspondent aux mois d'octobre à décembre 2018.

- **Protocole d'extraction**

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée sur colonne diaion HP-20. L'eau de déroulage a été traitée sur une colonne à grande échelle (1 kg de résine diaion). Au total, 481 litres d'eau ont été traités dans le cadre de ce projet.

Avant le passage sur colonne, une filtration de l'eau de déroulage a d'abord été nécessaire. Plusieurs techniques de filtration ont été testées : filtration sur coton, filtration sur coton et sable, et filtration sur capsule.

L'eau de déroulage a été passée telle quelle, après filtration, à travers la colonne. Les sucres et autres composés polaires ont été élués avec de l'eau. L'extraction des composés phénoliques a ensuite été effectuée à l'éthanol. Des quantités successives variant de 50 à 70 litres d'eau de déroulage ont pu être traitées en fonction de la saturation en composés phénoliques de la résine diaion (Tableau 2). Cette saturation est notable grâce à un ralentissement conséquent du débit de la colonne mais aussi par la couleur brune de la résine. Environ 20 litres d'eau ont permis d'entraîner la majorité des sucres en dehors de la colonne, puis environ 4 litres d'éthanol ont été nécessaires pour extraire tous les composés phénoliques de la résine diaion. Le processus d'extraction a répété plusieurs fois jusqu'à traiter les 481 litres d'eau de déroulage. Les extraits éthanoliques ont été rassemblés en trois lots puis évaporés à sec.

3.2.2 FRACTIONNEMENT

- **Fractionnement de l'extrait brut**

L'extrait brut a été fractionné sur 500 grammes de résine diaion HP-20. La masse sèche d'extrait brut a été solubilisée dans un minimum de solvant de départ (eau) et déposé sur la colonne. L'élution a été effectuée avec un gradient méthanol/eau (V : V) en commençant par 0% de méthanol, puis 20%, 30%, 40%, 50%, 70% et enfin 100% de méthanol. Les fractions ont été récoltées dans des erlenmeyers de 500 mL, analysées par CCM et rassemblées selon leur ressemblance. Une masse totale de 31,5 grammes d'extrait brut a été traitée en trois séparations successives pour obtenir les fractions A à G. Chacune des fractions a été séchée puis analysée par CCM et HPLC-MS et soumise aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- **Fractionnement des fractions D et E**

La première fraction travaillée a été la fraction D+E, c'est-à-dire la fraction D dont la masse a été enrichie par la fraction E. La séparation a été effectuée en phase normale sur une colonne de 350 grammes de silice en chromatographie liquide à basse pression. Environ 4 grammes d'échantillon ont été déposés sous forme de « dry pack » sur la colonne. L'élution a été effectuée à un débit de 40 mL/min avec un gradient $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (V : V) allant de 5 à 30% MeOH suivi d'un rinçage à 70 % puis à 100 % méthanol, le tout en 80 minutes. Des fractions de 18 mL ont été récupérées dans des tubes à essais et rassemblées en fractions selon le chromatogramme UV et après confirmation par analyse CCM.

Après avoir répété la manipulation trois fois pour un traitement total de 12,2 grammes de fraction D+E, neuf fractions ont été obtenues : D1 à D9. Chaque fraction a été évaporée à sec, analysée par CCM et HPLC-MS, et soumise aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- Fractionnement de D3

La fraction D3 a dans un premier temps été purifiée par une chromatographie en phase inverse sur 40 grammes de C18 en chromatographie liquide à basse pression. Environ 300 mg d'échantillon ont été déposés sur la colonne. L'élution a été effectuée à un débit de 12 mL/min avec un gradient $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (V : V) allant de 5 à 30 % pendant 60 minutes. Un rinçage à 100 % MeOH a ensuite été effectué pendant 5 minutes. Des fractions de 12 mL ont été récoltées dans des tubes à essai et rassemblées en 3 fractions (D3A, D3B, D3C) selon le chromatogramme UV et après confirmation par analyse CCM des tubes. Les fractions ont été évaporées à sec, et analysées par CCM et HPLC-MS.

Par la suite, 137 mg de la fraction D3B ont été dissouts à 80 mg/mL dans le DMSO et des injections successives de 100 μL ont été effectuées sur colonne C18 en HPLC préparative avec un gradient $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (V : V) allant de 25 à 50 % en 15 minutes, pour donner le composé **16** (56,5

mg, 0,179%) ainsi que deux composés inconnus **17** (6,4 mg, 0,020%) et **18** (4 mg, 0,013%). Les 3 composés ont été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis d'un lyophilisateur, puis analysés par HPLC-MS et RMN et le composé **16** a été soumis aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- Fractionnement de D4

La séparation de la fraction D4 a été effectuée sur une colonne C18 de 40 grammes en chromatographie liquide à basse pression. Environ 200 mg de masse sèche de la fraction ont été déposés sous forme de « dry pack » sur la colonne. L'élution a été effectuée à un débit de 20 mL/min de manière isocratique pendant 40 minutes en proportions MeOH : H₂O 30 : 70 (V : V) suivie d'un rinçage à 100 % MeOH pendant 5 minutes. Des fractions de 18 mL ont été récoltées dans des tubes à essai et rassemblées en fractions selon le chromatogramme UV et après confirmation par analyse CCM des tubes.

Cette manipulation a été effectuée trois fois, pour un traitement total de 632,8 mg de D4, pour obtenir le composé **2** (196, 9 mg) et la fraction D4B. Tous deux ont été évaporés à sec puis analysés par CCM et HPLC-MS. Le composé **2** a été analysé par RMN et soumis aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- Fractionnement de D6

La fraction D6 a dans un premier temps été purifiée par une chromatographie liquide à basse pression en phase inverse sur 40 grammes de C18. La fraction a été déposée sur la colonne sous forme de « dry pack ». L'élution a été effectuée à un débit de 20 mL/min dans un milieu isocratique de 30 % MeOH : H₂O (V : V) afin d'éliminer les molécules présentes en infime quantité (fraction D6B) et conserver une fraction enrichie en les deux molécules principales (fraction D6A). Les deux fractions

ont été évaporées à sec puis analysées par CCM et HPLC-MS. Un total de 922,2 mg de D6 a été traité.

Dans un second temps, les composés ont été purifiés en HPLC préparative sur colonne chirale à un débit de 4 mL/min avec un gradient IPA (alcool isopropylique) : hexane 40:60 (V : V) pendant 20 minutes.

Les deux diastéréoisomères, le composé **5** (200,3 mg, 0,636%) et le composé **6** (133,1 mg, 0,423%), ont été séparés, et le composé **3** a été obtenu en plus faible quantité (7 mg, 0,022%). Ces trois molécules ont été évaporées à sec, caractérisées (HPLC-MS, RMN, indice de rotation) et soumises aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- Fractionnement de D7

La fraction D7 a dans un premier temps été séparée en quatre fractions par une chromatographie liquide à basse pression en phase inverse sur 40 grammes de C18. Environ 150 mg de masse sèche de la fraction ont été déposés sous forme de « dry pack » sur la colonne. L'élution a été effectuée à un débit de 20 mL/min avec un gradient MeOH : H₂O (V : V) allant de 30 à 50 % de méthanol pendant 40 minutes et a été terminée par un rinçage allant de 50 à 100 % de méthanol pendant 10 minutes. Des fractions de 18 mL ont été récoltées dans des tubes à essai et rassemblées en fractions selon le chromatogramme UV et après confirmation par analyse CCM des tubes.

Cette manipulation a été effectuée cinq fois, pour un traitement total de 835,8 mg de D7. Quatre fractions ont été obtenues : D7A à D7D, toutes ont été évaporées à sec, puis analysées par CCM et par HPLC-MS.

- Fractionnement de D7A

La fraction D7A a été purifiée en HPLC préparative sur colonne C18 avec la méthode suivante : 10 à 14 % d'acétonitrile dans l'eau pendant 45 minutes. L'échantillon a été dissout à 80 mg/mL dans le DMSO et des injections successives de 100 µL ont été effectuées.

Cette purification a permis l'obtention des composés 7 (50 mg, 0,159%) et 5 (7,4 mg, 0,023%). Les composés ont été évaporés à sec puis analysés par RMN et soumis aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- Fractionnement de D7C

La fraction D7C a été purifiée en HPLC préparative sur colonne C18 avec un gradient MeOH : H₂O (V : V) allant de 25 à 45 % pendant 30 minutes. L'échantillon a été injecté à 80 mg/mL dans le DMSO pour obtenir la fraction D7C1 ainsi que les composés 19 (4,6 mg, 0,015%) et 20 (40,4 mg, 0,128%). Les trois fractions ont été évaporées à sec puis analysées par CCM et HPLC-MS. Les composés 19 et 20 ont été analysés par RMN et soumis aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

- **Fractionnement de la fraction C**

La fraction C a été fractionnée par une élution sur colonne ouverte de 50 grammes silice. Environ 700 mg de masse sèche de C ont été déposés sous forme de « dry pack » sur la colonne. Un gradient MeOH : CHCl₃ (V : V) avec des paliers de 5%, 10%, 15% et 20% MeOH suivis de rinçages successifs de 30 %, 50 %, 70 % et 100 % MeOH ont permis la séparation de C en 6 fractions rassemblées grâce à un suivi de la colonne par CCM. Après avoir répété la manipulation une seconde fois pour enrichir les fractions, un total de 1,444 g de C a été traité pour obtenir 6 fractions C1 à

C6 dont le composé **21** (34, 4 mg, 0,109%). Les fractions ont été évaporées à sec puis analysées par CCM et HPLC-MS, et soumise aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

○ Fractionnement de C5

La fraction C5 a été dissoute à 80 mg/mL dans le DMSO et des injections successives de 150 μ L ont été effectuées sur colonne C18 en HPLC préparative. Un gradient MeOH : H₂O (V : V) allant de 18 à 25 % MeOH pendant 35 minutes suivi d'un rinçage 100 % MeOH pendant 5 minutes ont permis l'obtention du composé **1** (34,9 mg, 0,111%) ainsi que l'enrichissement de la masse du composé **7** (4,1 mg, 0,013%). Chaque composé a été évaporé à sec, analysé par HPLC-MS et RMN, et soumis aux tests biologiques (voir Partie 3.3. Tests biologiques).

• **Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés**

(+)-Lyonirésinol **16**

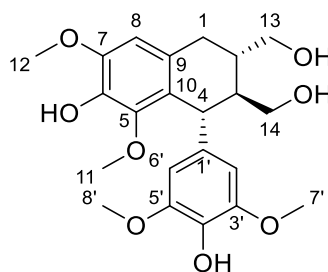


Figure 19 : Structure du (+)-lyonirésinol **16**

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D + 14,270^\circ$ (MeOH ; c 0,883 ; 21,9°C) ; m/z 455,1 $[M+Cl]^-$ (calculé pour C₂₂H₂₈O₈, 420,1784).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 149,0 (C-3', C-5'), 148,7 (C-8), 1447,68 (C-6), 139,3 (C-7), 138,9 (C-1'), 134,5 (C-4'), 130,2 (C-10), 126,2 (C-5), 107,7 (C-9), 106,8 (C-2', C-6'), 66,8 (C-13), 64,1 (C-14), 60,1 (C-11), 56,7 (C-7', C-8'), 56,8 (C-12), 49,0 (C-3), 42,3 (C-4), 40,9 (C-2), 33,6 (C-1).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 6,60 (s, 1H, H-9), 6,40 (s, 2H, H-2', H-6'), 4,33 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, H-4), 3,88 (s, 3H, H-12), 3,76 (s, 6H, H-7', H-8'), 3,62 (dd, $J = 10,7, 5,0$ Hz, 1H, H-13b), 3,51 (m, 3H, H-13a, H-14a, H-14b), 3,39 (s, 3H, H-11), 2,72 (dd, $J = 15,0, 4,8$ Hz, 1H, H-1a), 2,59 (dd, $J = 15,0, 11,4$ Hz, 1H, H-1b), 1,98 (m, 1H, H-3), 1,65 (m, 1H, H-2).

Carpinontriol A **2**

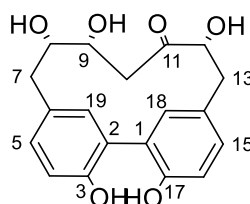
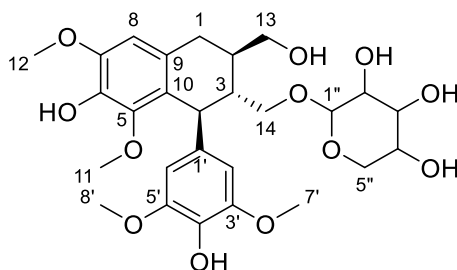


Figure 20 : Structure du carpinontriol A **2**

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D + 8,370^\circ$ (MeOH ; c 0,597 ; $20,9^\circ\text{C}$) ; m/z 343,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 344,1260).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 218,6 (C-11), 153,1 (C-17), 153,0 (C-3), 135,6 (C-19), 135,1 (C-18), 131,5 (C-15), 130,8 (C-5), 130,4 (C-6), 129,8 (C-14), 127,9 (C-1), 127,2 (C-2), 117,2 (C-4), 116,9 (C-16), 78,0 (C-12), 73,6 (C-9), 69,1 (C-8), 46,8 (C-10), 39,4 (C-7), 39,3 (C-13).

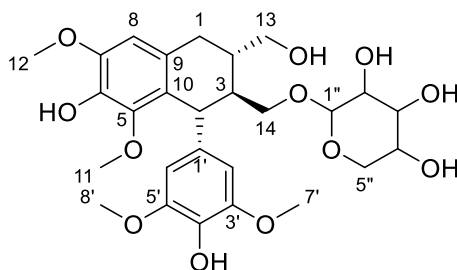
RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,06 (dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz, 1H, H-5), 7,01 (dd, $J = 8,1, 2,1$ Hz, 1H, H-15), 6,81 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, H-4), 6,79 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-16), 6,64 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-19), 6,56 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-18), 4,45 (dd, 1H, H-12), 4,12 – 3,97 (m, $J = 7,7$ Hz, 2H, H-8, H-9), 3,75 (d, $J = 18,5$ Hz, 1H, H-10a), 3,53 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, H-13a), 2,98 (dd, $J = 15,8, 2,6$ Hz, 1H, H-7a), 2,88 (dd, $J = 15,7, 9,1$ Hz, 1H, H-7b), 2,87 (dd, $J = 15,4, 6,5$ Hz, 1H, H-13b), 2,76 (dd, $J = 18,7, 8,4$ Hz, 1H, H-10b).

Lyoniside 5Figure 21 : Structure du lyoniside 5

Poudre blanchâtre amorphe ; $[\alpha]_D + 38,235^\circ$ (MeOH ; c 0,442 ; $20,5^\circ\text{C}$) ; m/z 551,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$, 552,2207).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 148,9 (C-3', C-5'), 148,6 (C-5), 147,5 (C-7), 139,4 (C-1'), 138,8 (C-6), 134,3 (C-4'), 130,0 (C-9), 126,4 (C-10), 107,7 (C-8), 106,8 (C-2', C-6'), 105,5 (C-1''), 78,0 (C-3''), 74,9 (C-2''), 71,2 (C-4''), 70,9 (C-14), 66,9 (C-5''), 65,9 (C-13), 60,0 (C-11), 56,8 (C-7', C-8'), 56,5 (C-12), 46,7 (C-3), 43,0 (C-4), 40,4 (C-2), 33,9 (C-1).

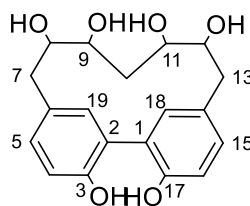
RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 6,53 (s, 1H, H-8), 6,39 (s, 2H, H-2', H-6'), 4,34 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, H-4), 4,18 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1''), 3,80 (m, $J = 7,5$ Hz, 5H, H-12, H-14a, H-5''a), 3,71 (s, 6H, H-7', H-8'), 3,62 (dd, $J = 10,8, 4,1$ Hz, 1H, H-13a), 3,52 (dd, $J = 10,9, 6,4$ Hz, 1H, H-13b), 3,47 – 3,41 (m, 1H, H-4''), 3,38 (dd, $J = 9,7, 3,8$ Hz, 1H, H-14b), 3,34 – 3,29 (m, 1H, H-3''), 3,30 – 3,26 (m, 3H, H-11), 3,20 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-2''), 3,18 – 3,12 (m, 1H, H-5''b), 2,68 (dd, $J = 15,2, 4,7$ Hz, 1H, H-1a), 2,65 – 2,56 (m, 1H, H-1b), 2,01 (s, 1H, H-3), 1,68 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H, H-2).

Nudiposide 6*Figure 22 : Structure du nudiposide 6*

Poudre blanchâtre amorphe ; $[\alpha]_D - 60,550^\circ$ (MeOH ; c 0,434 ; $20,2^\circ\text{C}$) ; m/z 551,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$, 552,2207).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 148,9 (C-3', C-5'), 148,6 (C-5), 147,5 (C-7), 139,6 (C-1'), 138,8 (C-6), 134,4 (C-4'), 130,1 (C-9), 126,3 (C-10), 107,7 (C-8), 106,9 (C-2', C-6'), 105,0 (C-1''), 77,9 (C-3''), 74,9 (C-2''), 71,2 (C-4''), 71,0 (C-14), 67,1 (C-5''), 66,0 (C-13), 59,9 (C-11), 56,8 (C-7', C-8'), 56,5 (C-12), 46,9 (C-3), 43,3 (C-4), 40,6 (C-2), 34,0 (C-1).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 6,56 (s, 1H, H-8), 6,41 (s, 2H, H-2', H-6'), 4,21 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, H-4), 4,09 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1''), 3,85 (s, 5H, H-12, H-14a, H-5''a), 3,74 (s, 6H, H-7', H-8'), 3,63 (s, 2H, H-13), 3,58 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, H-14b), 3,50 (m, 1H, H-4''), 3,28 (s, 3H, H-11), 3,26 (s, 1H, H-3''), 3,20 (s, 1H, H-2''), 3,13 (s, 1H, H-5''b), 2,70 (m, 2H, H-1), 2,01 (s, 1H, H-3), 1,71 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, H-2).

Betulatétraol 3*Figure 23 : Structure du betulatétraol 3*

Poudre marron amorphe ; $[\alpha]_D - 12,844^\circ$ (MeOH ; c 0,109 ; $21,9^\circ\text{C}$) ; HRMS : m/z : 346,1417
 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$, 346,1416).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 152,7 (C-3, C-17), 135,3 (C-18, C-19), 130,8 (C-6, C-14), 130,6 (C-5, C-15), 127,4 (C-1, C-2), 117,1 (C-4, C-16), 71,2 (C-8, C-12), 67,7 (C-9, C-11), 42,1 (C-10), 36,3 (C-7, C-13).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,04 (dd, $J = 8,2, 2,0$ Hz, 2H, H-5, H-15), 6,81 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H, H-18, H-19), 6,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H-4, H-16), 4,36 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-8, H-12), 4,08 (dd, $J = 7,6, 4,6$ Hz, 2H, H-9, H-11), 2,98 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H, H-7, H-13), 2,23 (dd, $J = 7,8, 4,5$ Hz, 2H, H-10).

(+)-Lyonirésinol 14-O- β -glucopyranoside 7

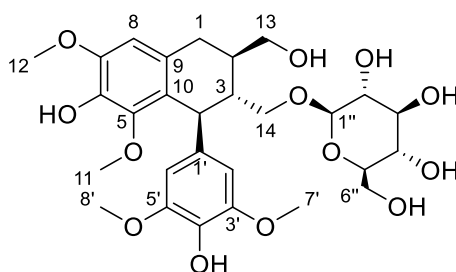


Figure 24 : Structure du glucoside de lyonirésinol 7

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D + 43,703^\circ$ (MeOH ; c 0,794 ; $20,7^\circ\text{C}$) ; m/z 581,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$
 (calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$, 582,5990).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 149,0 (C-3', C-5'), 148,6 (C-8), 147,6 (C-6), 139,4 (C-1'), 138,9 (C-7), 134,4 (C-4'), 130,2 (C-10), 126,4 (C-5), 107,8 (C-9), 106,9 (C-2', C-6'), 104,8 (C-1''), 78,2 (C-3''), 78,0 (C-5''), 75,2 (C-2''), 71,7 (C-4''), 71,4 (C-14), 66,2 (C-13), 62,8 (C-6''), 60,1 (C-11), 56,8 (C-7', C-8'), 56,6 (C-12), 46,7 (C-3), 42,8 (C-4), 40,6 (C-2), 33,9 (C-1).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 6,60 (s, 1H, H-9), 6,45 (s, 2H, H-2', H-6'), 4,44 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-4), 4,30 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H-1''), 3,92 (m, 1H, H-14), 3,88 (s, 4H, H-6, H-12), 3,77 (s, 6H, H-7', H-8'), 3,69 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, H-6''), 3,66 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H, H-13), 3,57 (m, 1H, H-14), 3,47 (dd, $J = 9,8, 4,0$ Hz, 1H, H-14), 3,40 (m, 1H, H-3''), 3,39 (m, 3H, H-11), 3,30 (m, 1H, H-4''), 3,28 (m, 1H, H-5''), 3,25 (m, 1H, H-2''), 2,74 (dd, $J = 15,2, 4,7$ Hz, 1H, H-1), 2,64 (m, 1H, H-1), 2,09 (m, 1H, H-1), 1,74 (m, 1H, H-2)

Rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose **19**

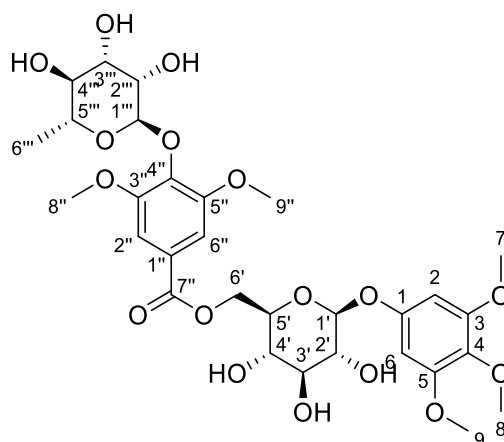


Figure 25 : Structure du rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose **19**

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D - 59,722^\circ$ (MeOH ; c 0,072 ; $22,0^\circ\text{C}$) ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 284 (4,6) nm ; IR ν_{max} 3394, 1597, 1504, 1224, 1133, 1073 cm^{-1} ; HRMS : m/z : 672,2265 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$, 672,2265).

Les données RMN sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplage pour chaque position du composé **19**

Position	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm) (multiplicité, J (Hz))
1	156,3	-
2 6	97,1	6,37 (s)
3 5	155,5	-
4	133,5	-
7 9	57,2	3,61 (s)
8	62,0	3,66 (s)
1''	127,7	-
2'' 6''	108,5	7,32 (s)
3'' 5''	155,4	-
4''	140,8	-
7''	168,1	-
8'' 9''	57,4	3,83 (s)
1'	103,5	4,88 (d, 7,5)
2'	74,5	3,45 (m)
3'	78,3	3,51 (m)
4'	73,0	3,41 (m)
5'	76,5	3,79 (s)
6'	66,4	4,78 (m)
1'''	104,4	5,37 (s)
2'''	73,0	4,13 (s)
3'''	72,8	3,90 (dd, 9,5, 3,3)
4'''	75,5	3,47 (m)
5'''	72,2	4,26 (dd, 9,8, 6,6)
6'''	18,6	1,23 (d, 6,2)

Glycoside d'hannokinol **20**

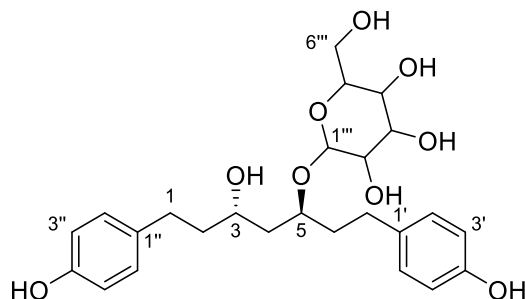


Figure 26 : Structure du glucoside d'hannokinol **20**

Poudre blanchâtre amorphe ; $[\alpha]_D - 11,886^\circ$ (MeOH ; c 0,631 ; $21,8^\circ\text{C}$) ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 287 (3,5) nm ; IR ν_{max} 3402, 2925, 1518, 1234, 1076, 1020 cm^{-1} ; HRMS : m/z 478,2198 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_9$, m/z 478,2203).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 156,3 (C-4''), 156,2 (C-4'), 134,7 (C-1'), 134,6 (C-1''), 130,4 (C-2'', C-6''), 130,3 (C-2', C-6'), 116,1 (C-3'', C-5''), 166,0 (C-3', C-5'), 104,3 (C-1'''), 78,4 (C-5), 78,2 (C-3'''), 77,8 (C-5'''), 75,5 (C-2'''), 71,6 (C-4'''), 68,3 (C-3), 62,7 (C-6'''), 43,0 (C-4), 41,3 (C-2), 39,1 (C-6), 32,2 (C-1), 31,6 (C-7).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,05 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,02 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6,71 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,69 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4,41 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1'''), 3,96 (m, 1H, H-5), 3,94 (m, 1H, H-3), 3,89 (dd, $J = 11,8$ Hz, 2,0 Hz, 1H, H-6'''a), 3,73 (dd, $J = 11,7$ Hz, 5,1 Hz, 1H, H-6'''b), 3,38 (m, 1H, H-4'''), 3,36 (m, 1H, H-3'''), 3,29 (m, 1H, H-5'''), 3,22 (m, 1H, H-2'''), 2,72-2,51 (m, 4H, H-1a, H-1b, H-7a, H-7b), 1,97 (m, 1H, H-6a), 1,83-1,70 (m, 2H, H-6b, H-4a), 1,69-1,61 (m, 3H, H-4b, H-2a, H-2b).

Koaburaside monomethyl ether **21**

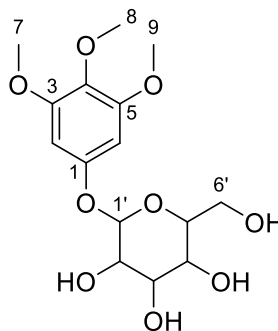


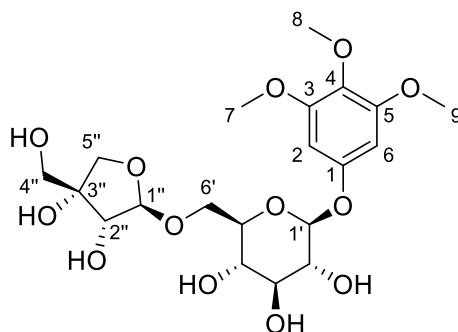
Figure 27 : Structure du koaburaside monométhyl éther **21**

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D - 36,431^\circ$ (MeOH ; c 0,538 ; $22,1^\circ\text{C}$) ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 285 (2,8) nm ; IR ν_{max} 3401, 2937, 1602, 1506, 1133, 1075 cm^{-1} ; HRMS m/z 346,1267 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 346,1264).

Les données RMN sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Déplacements chimiques, multiplicité et constantes de couplage pour chaque position du composé **21**

Position	^{13}C (ppm)	^1H (ppm) (multiplicité, J (Hz))
1	156,1	-
2	96,0	6,49 (s)
6		
3		
5	154,8	-
4	134,3	-
7	56,5	3,81 (s)
9		
8		
1'	103,2	4,81 (d, 7,4)
2'	74,9	3,45 (m)
3'	78,0	3,47 (m)
4'	71,7	3,35 (s)
5'	78,4	3,43 (m)
6'a	62,7	3,92 (dd, 12,0, 2,1)
6'b		3,65 (m)

Kelampayoside A 1*Figure 28 : Structure du kelampayoside A 1*

Poudre blanche amorphe ; $[\alpha]_D - 91,193^\circ$ (MeOH ; c 0,545 ; 22,2°C) ; m/z 513,1 $[M+Cl]^-$ (calculé pour $C_{20}H_{30}O_{13}$, 478,1686).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 155,9 (C-1), 154,8 (C-3, C-5), 134,6 (C-4), 110,8 (C-1''), 103,1 (C-1'), 96,3 (C-2, C-6), 80,5 (C-3''), 77,9 (C-2''), 77,8 (C-3'), 77,0 (C-5'), 74,9 (C-5''), 74,9 (C-2'), 71,6 (C-4'), 68,7 (C-6'), 65,3 (C-4''), 61,2 (C-8), 56,7 (C-7, C-9).

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) δ 6,46 (s, 2H, H-2, H-6), 4,97 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-1''), 4,80 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-1'), 4,05 (m, 1H, H-6'), 3,95 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H-5''), 3,88 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-2''), 3,82 (s, 6H, H-7, H-9), 3,74 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H-5'), 3,71 (s, 3H, H-8), 3,60 (m, 2H, H-6'), 3,55 (s, 2H, H-4''), 3,45 (m, 1H, H-3'), 3,43 (m, 1H, H-2'), 3,32 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-4').

3.3. TESTS BIOLOGIQUES

Tout au long du projet, tous les extraits et fractions ont été soumis à des tests biologiques afin de guider les travaux de fractionnement. Les activités cytotoxique, anti-inflammatoire et antioxydante ont été mesurées. Les tests biologiques ont été réalisés deux fois à intervalle de plusieurs mois pour les fractions, et à intervalle d'une semaine pour les molécules pures. L'extrait

brut a été testé à chaque test de fractions ou de molécules pures. Les mesures de fluorescence ont toutes été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FL™.

3.3.1. ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE *IN VITRO*

Les tests cytotoxiques permettent de déterminer si l'échantillon testé inhibe la croissance de cellules cancéreuses et de cellules saines. Le principe du test est de mesurer la capacité de l'échantillon à inhiber la croissance de différentes lignées de cellules. Les lignées de cellules cancéreuses testées étaient celles de poumons (A549) et colorectales (DLD-1), tandis que les lignées de cellules saines étaient les fibroblastes (WS-1, cellules du derme). Dans le cadre d'une utilisation de l'extrait en cosmétologie, il était impératif que ce dernier n'inhibe pas la croissance des cellules de la peau. Ainsi, afin de compléter les tests cytotoxiques, l'activité de l'extrait a aussi été testée sur des kératinocytes (HaCaT, cellules de l'épiderme). Dans un premier temps, les échantillons ont été solubilisés à différentes concentrations puis incubés avec environ 5000 cellules de chaque lignée cellulaire pendant 48 heures. La cytotoxicité de chaque échantillon a ensuite pu être mesurée en les traitant à la résazurine¹⁰⁵, permettant de mesurer le métabolisme cellulaire. Si une activité cellulaire est présente, la résazurine est en effet réduite en résorufine, dont la fluorescence est proportionnelle à l'activité cellulaire. La fluorescence a été mesurée avec des longueurs d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm. Un second test a permis de compléter l'évaluation de la cytotoxicité des cellules : le test de Hoescht, qui permet de quantifier l'ADN cellulaire. Pour réaliser cette expérience, le surnageant a été retiré des puits de la plaque et les cellules ont été lysées afin de libérer leur ADN et permettre au réactif de Hoescht de s'y lier. Une fois lié à l'ADN, ce réactif devient fluorescent. Ainsi, une mesure de la fluorescence du réactif, proportionnelle à la quantité d'ADN, a permis de déterminer la présence ou l'absence de croissance cellulaire. Les résultats ont été rapportés en IC₅₀, qui exprime la concentration d'échantillon nécessaire à l'inhibition de 50% de la croissance cellulaire. L'étoposide, un anticancéreux, a été utilisé comme témoin positif.

3.3.2. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante a été mesurée suivant deux tests : un test chimique et un test cellulaire¹⁰⁶. Le test chimique, appelé ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)¹⁰⁷, permet de déterminer la capacité d'un échantillon à neutraliser les radicaux peroxyde sur une sonde fluorescente : la fluoresceine. Le principe du test est de vérifier si la fluoresceine, non fluorescente si oxydée, présente toujours une fluorescence après mise en contact avec l'échantillon à tester. Pour ce faire, les échantillons en présence de la fluoresceine ont été mélangés à un oxydant : le 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). Les tests se sont déroulés à une température de 37,5°C et maintenus à pH 7,4 par un tampon phosphate. La fluorescence a été mesurée toutes les minutes pendant 60 minutes. Les résultats ont finalement été calculés en comparant les aires sous les courbes de diminution de la fluorescence entre le blanc et les échantillons testés. Les résultats ont été exprimés en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme d'échantillon ($\mu\text{mol TE/mg}$), le Trolox étant le témoin positif pour cette expérience.

Le test cellulaire, quant à lui, a été effectué sur des fibroblastes (WS-1). Des plaques de 96 puits contenant 10 000 cellules WS-1 par puits ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées avec 150 μL de solution saline à pH 7,4 (PBS) et réincubées pendant 30 minutes avec 100 μL de solution saline (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) contenant 5 μM de 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). Il s'agit d'un fluorochrome qui permet de déterminer l'oxydation à l'intérieur des cellules. Par la suite, les cellules ont à nouveau été lavées avec 150 μL de PBS et incubées avec des concentrations croissantes d'échantillon avec ou sans 200 μM de tert-butylhydroperoxide (t-BuOOH) pendant une heure pour obtenir l'activité antioxydante. La fluorescence a été mesurée immédiatement après l'ajout de t-BuOOH et 90 minutes plus tard avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 et 538 nm respectivement. L'IC₅₀, c'est-à-dire la concentration d'échantillon permettant d'inhiber 50% de l'oxydation cellulaire, a ensuite été comparée aux témoins positifs : la quercétine, le trolox et la catéchine.

3.3.3. ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE

Enfin, l'activité anti-inflammatoire a été déterminée grâce à la mesure de l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) produit par des macrophages de souris (RAW 264.7)¹⁰⁸. Pour effectuer cette mesure, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits puis incubées une nuit à 37°C avec 5% de CO₂. Elles ont ensuite été traitées avec des concentrations croissantes d'échantillon à tester puis réincubées dans les mêmes conditions. À titre de comparaison, un inhibiteur de la production de NO connu, le N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), a été utilisé comme contrôle positif. Après 24 heures, un ajout de 100 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS) a été effectué afin de stimuler la production de NO par les macrophages. Après 24 heures d'incubation, les surnageants ont été récoltés puis mis en contact avec le réactif de Griess pour doser la concentration en NO. En effet, ce réactif change de teinte en fonction de la concentration en NO. L'absorbance des puits a alors été mesurée par un lecteur de plaques Varioskan à une longueur d'onde de 540 nm. Les résultats obtenus ont été exprimés en IC₅₀ représentant la concentration d'échantillon permettant d'inhiber 50% de la production de NO.

CONCLUSION

En conclusion, ce projet de maîtrise a permis de développer une méthode de production d'un extrait enrichi en composés antioxydants utilisable en cosmétique. La méthode de production, plus particulièrement le mode de filtration de l'eau de déroulage, pourrait être adaptée pour une plus grande production de l'extrait enrichi en composés phénoliques.

L'extrait brut a montré une forte activité antioxydante ORAC et cellulaire. Le fractionnement bioguidé a permis d'isoler douze composés purs dont la majorité possède un fort potentiel antioxydant ORAC qui explique l'activité de l'extrait enrichi. Dix de ces composés purs ont été identifiés grâce à des analyses HPLC-MS complétées par des analyses RMN approfondies (^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, HSQC, HMBC). Il s'agit du lyonirésinol 16, du carpinontriol A 2, du lyoniside 5, du nudiposide 6, du betulatétranol 3, du glucoside de lyonirésinol 7, du rhamnoside de triméthoxyphénylsyringoyl glucose 19, du glucoside d'hannokinol 20, du koaburaside monométhyl éther 21 et du kelampayoside A 1. Parmi ces composés, au moins quatre n'avaient pas été isolés dans l'eau de déroulage lors des travaux préliminaires (16, 19, 20, 21). Le composé 21 a été identifié pour la première fois dans la famille des *Betulaceae* alors que le composé 19 est une nouvelle molécule qui n'avait jamais été isolée dans la nature auparavant.

Parmi les dix molécules identifiées, le carpinontriol A 2 et le kelampayoside A 1 sont de bons candidats pour la standardisation de l'extrait parce qu'ils sont présents en quantité importante et rapidement identifiables sur le chromatogramme HPLC-MS de l'extrait brut. Concernant l'activité antioxydante, ce sont les composés 2 et 20 qui présentent l'activité la plus importante. Toutefois, il est plus judicieux de conserver l'extrait brut au sein des formulations puisqu'il reste le meilleur compromis entre une bonne activité antioxydante et une méthode d'obtention plus accessible.

Concernant les molécules déjà isolées, plusieurs travaux restent à achever : dans un premier temps, deux composés restent non identifiés (17 et 18) et les tests biologiques sont à compléter pour certaines molécules qui n'ont pas été isolées en quantité suffisante. Pour les travaux futurs, il serait donc pertinent d'isoler ces molécules en plus grande quantité afin de parvenir à identifier les molécules inconnues et à compléter les tests biologiques surtout pour le composé 19 nouvellement

isolé. Il serait aussi intéressant de vérifier la configuration absolue des composés **3** et **20**. Enfin, d'autres fractions n'ont pas encore été étudiées telles que la fraction F.

Finalement, ces travaux de maîtrise ont montré que l'eau de déroulage de bouleau est une ressource extrêmement riche et complexe dont l'étude mérite d'être poursuivie afin de découvrir d'autres molécules d'intérêt biologique.

LISTE DES RÉFÉRENCES

1. Ministère de l'Energie et des Ressources Naturelles Bref portrait de la forêt boréale au Québec. <https://mern.gouv.qc.ca/presse/feux-grands.jsp> (accessed 29 juillet 2019).
2. Gouvernement du Canada Cahier d'information sur la forêt 2018-2019. <https://www.rncan.gc.ca/nos-ressources-naturelles/forets-et-foresterie/cahier-dinformation-foret-2018-2019/21705> (accessed 29 juillet 2019).
3. Anderson, J.; Ball, J.; Bourke, I. J.; Braatz, S.; Clément, J.; Dembner, S.; Palmberg-Lerche, C.; Perlis, A.; Russo, L., Non-wood Forest Products and Income Generation. *Unasylva* 1999.
4. Boucher, J. L., Evolution du régime forestier et crise forestière. Partie I : La dimension sociale de la crise. *Revue vie économique* **2010**, 2 (1).
5. Groupe Remabec Industries John Lewis. <https://www.remabec.com/fr-ca/industrie-johnlewis-ltee/> (accessed 26 septembre 2019).
6. Barbulova, A.; Colucci, G.; Apone, F., New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* **2015**, 2 (2), 82-92.
7. Canadensys Vascan, *Betula papyrifera* Marshall. <https://data.canadensys.net/vascan/taxon/3697?lang=fr> (accessed 27/01/2020).
8. Committee, F. o. N. A. E., *Flora of North America : North of Mexico Volume 3 : Magnoliophyta : Magnoliidae and Hamamelidae*. Université d'Oxford: Oxford, 1997; Vol. 3, p 616.
9. Bruneton, J., *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 3 ed.; Éditions médicales internationales Editions Technique & Documentation: 1999; p 1120.
10. Lorrain, E., *Grand Manuel de phytothérapie*. Dunod: 2019; p 1296.
11. Tang, J.; Li, J.; Qi, W.; Qiu, W.; Li, P.; Li, B.; Song, B., Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metabolism* **2011**, 13 (1), 44-56.
12. Ebeling, S.; Naumann, K.; Pollok, S.; Wardecki, T.; Vidal-Y-Sy, S.; Nascimento, J.; Boerries, M.; Schmidt, G.; Brandner, J.; Merfort, I., From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. *Plos One* **2014**, 9 (1).
13. Marles, R. The ethnobotany of the Chipewyan of Northern Saskatchewan. Thèse de doctorat, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada, 1984.
14. Andre, A. Nan t'aih nakwits'inahtsih (The land gives us strength) : The medicine plants used by Gwich'in people of Canada's western arctic to maintain good health and well being. Thèse de doctorat, University of Victoria, British Columbia, Canada, 2006.
15. Leighton, A.-L., *Wild plant use by the Woods Cree (Nihithawak) of East-Central Saskatchewan*. Ottawa : National Museums of Canada, 1985; p 136.
16. Andre, A.; Fehr, A., Gwich'in ethnobotany: Plants used by the Gwich'in for food, medicine, shelter and tools. Gwich'in Social and Cultural Institute, Tsiigehtchic, and Aurora Research Institute: Inuvik, Northwest Territories, 2002.
17. Siegfried, E.-V. Ethnobotany of the Northern Cree of Wabasca/Desmarais. Mémoire de maîtrise, Université de Calgary, Calgary, Alberta, Canada, 1994.
18. Marles, R.; Clavelle, C.; Monteleone, L.; Tays, N.; Bruns, D., *Aboriginal plant use in Canada's northwest boreal forest*. UBC Press: Vancouver, 2000; p 256.
19. Ryan, J., *Traditional Dene medicine. Part one : Report*. Lac La Martre, Northwest Territories : Dene Cultural Institute, 1994.

20. Mechling, W.-H., The Malecite Indians, with notes on the Micmacs. *Anthropologica* **1959**, 8, 239-263.
21. Driedger, C.-J. A journey of a thousand miles begins with a single blueberry: Learning journeys of the Whitefeather Forest, Pikangikum First Nation, Ontario. Mémoire de maîtrise, Université de Manitoba, Natural Resource Institute, Winnipeg, Manitoba, 2006.
22. Clément, D., *L'ethnobotanique montagnaise de Mingan*. Centre d'études nordiques, Université Laval, Québec, 1990.
23. Marshall, S.; Diamond, L.; Blackned, S., *Healing ourselves, helping ourselves: The medicinal use of plants and animals by the people of Waskaganish*. Cree Regional Authority: Québec, 1989; p 70.
24. Moerman, D. E., *Native American ethnobotany*. Timber Press: Portland, Oregon, 1998; p 927 pages.
25. Bouchard, M.; Vallée, V.; Boudreault, A., Identification d'utilisations pour le bouleau à papier et le peuplier faux-tremble. *Centre de recherche industrielle du Québec* **2013**.
26. Yamamoto, A.; Rohumaa, A.; Kontturi, E.; Hughes, M.; Saranpää, P.; Andberg, M.; Vuorinen, T., Colorimetric Behavior and Seasonal Characteristic of Xylem Sap Obtained by Mechanical Compression from Silver Birch (*Betula pendula*). *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2013**, 1, 1075-1082.
27. Urbas, B.; Adams, A.; C.T., B., Isolation and some structural features of a polysaccharide from birch sap. *Canadian Journal of Chemistry* **1965**, 42, 2093-2100.
28. Haq, S.; Adams, G., Oligosaccharides of birch sap. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1962**, 40, 989-997.
29. Kallio, H.; Ahtonen, S.; Raulo, J.; Linko, R. R., Identification of the Sugars and Acids in Birch Sap. *Journal of Food Science* **1985**, 50, 266-267.
30. Kallio, H.; Ahtonen, S., Identification and Seasonal Variations of Amino Acids in Birch Sap Used for Syrup Production. *Food Chemistry* **1989**, 33, 125-132.
31. Kallio, H.; Ahtonen, S., Seasonal Variations of the Acids in Birch Sap. *Food Chemistry* **1987**, 25, 285-292.
32. Kallio, H.; Ahtonen, S., Seasonal Variations of the Sugars in Birch Sap. *Food Chemistry* **1987**, 25, 293-304.
33. Millard, P.; Wendler, R.; Hepburn, A.; Smith, A., Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant, Cell & Environment* **1998**, 21, 715-722.
34. Seung-Lak, Y.; Jong-Soo, J.; Tae-Ok, K., Utilization and Tapping of the Sap from Birches and Maples. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* **1992**, 20 (4), 15-20.
35. Svanberg, I.; Söukand, R.; Łuczaj, Ł.; Kalle, R.; Zyryanova, O.; Dénes, A.; Papp, N.; Nedelcheva, A.; Šeškauskaitė, D.; Kołodziejska-Degórska, I.; Kolosova, V., Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2012**, 81 (4), 343-357.
36. Moriyama, M.; Naru, E.; Misaki, Y.; Hayashi, A., Effect of Birch (*Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara) sap on cultured human epidermal keratinocyte differentiation. *Journal of Cosmetic Chemists* **2008**, 42, 94-101.
37. Bai, T. Antibacterial hair growth white vinegar shampoo. CN 107519102, 2017.
38. Park, S. Y.; Noh, A. R.; Jung, S. H. Cosmetic composition of skin irritation mitigation and skin barrier improvement effect comprising Centella asiatica extract, ceramide, and birch sap. KR 2017103172, 2017.
39. Oancea, I. A.; Oancea, E.; Oancea, T.-N.; Oancea, D. Regenerative and revitalizing dermatocosmetic vegetal composition. RO 132134, 2017.

40. Guillaín, F., *La sève de bouleau*. Editions du Rocher: 2017; p 64.
41. Baruah, P.; Swain, T., Beta-Glycosidase of Potato. *Biochemical Journal* **1957**, *66* (2), 321-323.
42. Bonaterra, G. A.; Heinrich, E. U.; Kelber, O.; Weiser, D.; Metz, J.; Kinscherf, R., Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine* **2010**, *17* (14), 1106-1113.
43. Shi, H.-M.; Wen, J.; Jia, C.-Q.; Jin, W.; Zhang, X.-F.; Yao, Z.-R.; Tu, P.-F., Two New Phenolic Glycosides from the Barks of *Hydnocarpus annamensis* and their Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation. *Planta Medica* **2006**, *72*, 267-274.
44. Wu, Q.; Fu, D.-X.; Hou, A.-J.; Lei, G.-Q.; Liu, Z.-J.; Chen, J.-K.; Zhou, T.-S., Antioxidative Phenols and Phenolic Glycosides from *Curculigo orchioides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *53* (8), 1065-1067.
45. Wang, M.; Shao, Y.; Li, J.; Zhu, N.; Rangarajan, M.; LaVoie, E. J.; Ho, C.-T., Antioxidative Phenolic Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Natural Products* **1999**, *62* (3), 454-456.
46. Zhang, L.-J.; Huang, H.-T.; Huang, S.-Y.; Lin, Z.-H.; Shen, C.-C.; Tsai, W.-J.; Kuo, Y.-H., Antioxidant and Anti-Inflammatory Phenolic Glycosides from *Clematis tashiroi*. *Journal of Natural Products* **2015**, *78* (7), 1586-1592.
47. Mazur, W., Phytoestrogen content in foods. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**, *12* (4), 729-742.
48. Mazur, W.; Wähälä, K.; Rasku, S.; Salakka, A.; Hase, T.; Adlercreutz, H., Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *British Journal of Nutrition* **1998**, *79* (1), 37-45.
49. Kuiper, G.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B.; Corton, J. C.; Safe, S. H.; Van der Saag, P. T.; Van der Burg, B.; Gustafsson, J.-A., Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor beta. *Endocrinology* **1998**, *139* (10), 4252-4263.
50. Wang, L.-Q., Mammalian phytoestrogens : enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography B* **2002**, *777* (1-2), 289-309.
51. Velentzis, L. S.; Cantwell, M. M.; Cardwell, C.; Keshtgar, M. R.; Leathem, A. J.; Woodside, J. V., Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women : meta-analyses of observational studies. *British Journal of Cancer* **2009**, *100* (9), 1492-1498.
52. Xu, H.; Lv, M.; Tian, X., A Review on Hemisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: 2003-2007 *Current Medical Chemistry* **2009**, *16* (3), 327-349.
53. Fauré, M.; Lissi, E.; Torres, R.; Videla, L.-A., Antioxidant activities of lignans and flavonoids. *Phytochemistry* **1990**, *29* (12), 3773-3775.
54. Ohta, S.; Aoki, T.; Hirata, T.; Suga, T., The Structures of Four Diarylheptanoid Glycosides from the Female Flowers of *Ainus serrulatooides* *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1984**, 1635-1642.
55. Itokawa, H.; Morita, H.; Midorikawa, I.; Aiyama, R.; Morita, M., Diarylheptanoids from the Rhizome of *Alpinia officinarum* HANCE. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1985**, *33* (11), 4889-4893.
56. Ma, J.; Jin, X.; Yang, L.; Liu, Z.-L., Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (8), 1137-1143.
57. Nagumo, S.; Ishizawa, S.; Nagai, M.; Inoue, T., Studies on the Constituents of *Aceraceae* Plants. XI. Two Types of Cyclic Diarylheptanoid from *Acer nikoense*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *44* (5), 1086-1089.

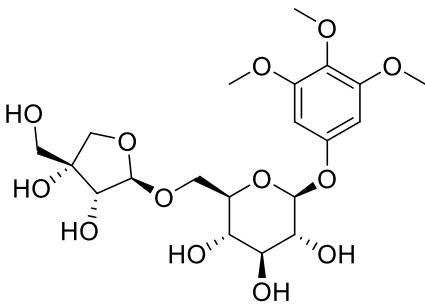
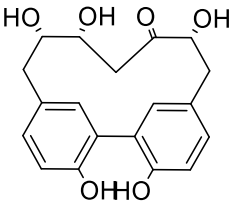
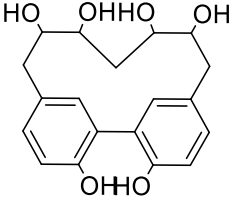
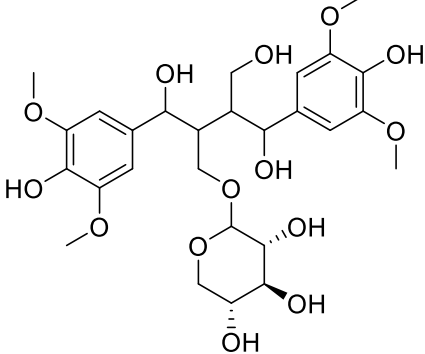
58. Fadus, M. C.; Lau, C.; Lynch, H. T., Curcumin : An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2017**, 7 (3), 339-346.
59. Goel, A.; Kunnumakkara, A. B.; Aggarwal, B. B., Curcumin as "Curecumin" : From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* **2008**, 75 (4), 787-809.
60. Menon, V. P.; Sudheer, A. R., Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer: Boston, MA, 2007; pp 105-125.
61. Zhou, C. X.; Zhang, X. Y.; Dong, X. W.; Tao, Q. F.; Dou, H.; Zhang, R. P.; Huang, K. X.; Li, X. K.; Chen, C. X.; Zeng, S.; Zhao, Y., Three new diarylheptanoids and their antioxidant property. *Chinese Chemical Letters* **2007**, 18 (10), 1243-1246.
62. Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Sakagami, H.; Sashida, Y., New Diarylheptanoids and Diarylheptanoid Glucosides from the Rhizomes of *Tacca chantrieri* and Their Cytotoxic Activity. *Journal of Natural Products* **2002**, 65 (3), 283-289.
63. Mshvildadze, V.; Legault, J.; Lavoie, S.; Gauthier, C.; Pichette, A., Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2531-2536.
64. Shindo, Y.; Witt, E.; Packer, L., Antioxidant Defense Mechanisms in Murine Epidermis and Dermis and Their Responses to Ultraviolet Light. *Journal of Investigative Dermatology* **1993**, 100 (3), 260-265.
65. Park, J.; Lee, J.; Choi, C., Mitochondrial Network Determines Intracellular ROS Dynamics and Sensitivity to Oxidative Stress through Switching Inter-Mitochondrial Messengers. *PLoS ONE* **2011**, 6 (8).
66. Poljsak, B.; Dahmane, R., Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice* **2012**, 1-4.
67. Stolzing, A.; Grune, T., The proteasome and its function in the ageing process. *Clinical and Experimental Dermatology* **2001**, 26 (566-572).
68. Brenner, M.; Hearing, V., The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol* **2007**, 84 (3), 539-549.
69. Farage, M. A.; Miller, K. W.; Elsner, P.; Maibach, H. I., Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Journal of Cosmetic Science* **2007**, 30 (2), 87-95.
70. Petersen, M. J.; Hansen, C.; Craig, S., Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **1992**, 99, 440-444.
71. Beylot, C., Vieillissement cutané. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* **2008**, 135, 157-161.
72. Ziegler, A.; Jonason, A. S.; Leffell, D. J.; Simon, J. A.; Sharma, H. W.; Kimmelman, J.; Remington, L.; Jacks, T.; Brash, D. E., Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **1994**, 372, 773-776.
73. Aryal, S.; Baniya, M. K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R.; Koirala, N., Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* **2019**, 8 (94).
74. Li, L.; Seeram, N.-P., Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 11673-11679.
75. Liu, H.; Sui, X.; Li, X.; Li, Y., Lyoniresinol inhibits melanogenic activity through the induction of microphthalmia-associated transcription factor and extracellular receptor kinase activation. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2013**, 373, 211-216.

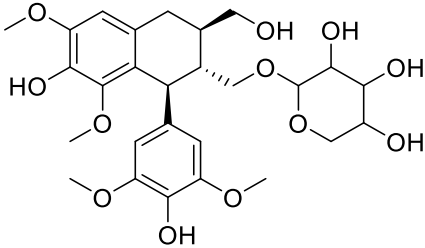
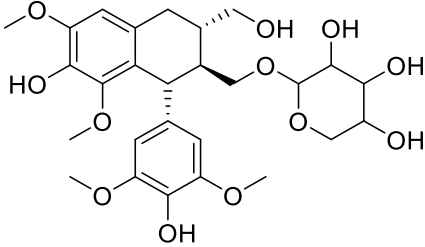
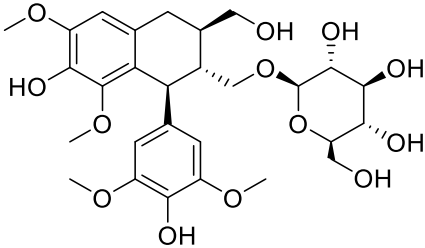
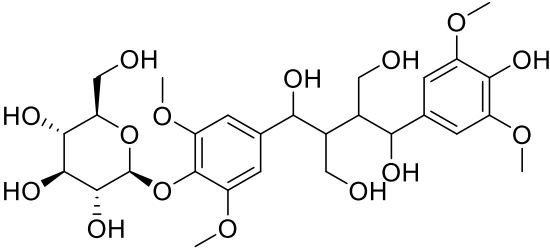
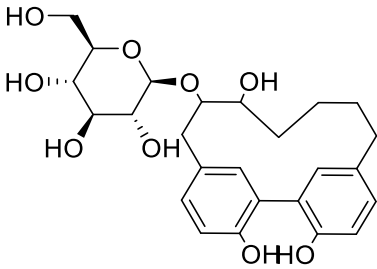
76. Moo-Puc, J. A.; Martin-Quintal, Z.; Miron-Lopez, G.; Moo-Puc, R. E.; Quijano, L.; Mena-Rejon, G. J., Isolation and antitrichomonal activity of the chemical constituents of the leaves of *Maytenus phyllanthoides* Benth. (Celastraceae). *Quimica Nova* **2014**, 37 (1), 85-88.
77. Choi, S. E.; Yoon, J. H.; Park, K. H.; Kim, K. Y.; Song, Y. J.; Jin, H. Y.; Lee, M. W., Whitening Activity of Phenolic Compounds from Rhizome of *Phragmites communis*. *Natural Product Sciences* **2014**, 20 (4), 269-273.
78. Kim, S. C.; Ko, H. N.; Hyun, C.-G.; Jong, S. B.; Bu, H. J.; Nam, H. L., Anti-inflammatory Constituents from Branches of *Corylus hallaisanensis* Nakai. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2015**, 5 (12), 162-166.
79. Ko, H. N.; Oh, T. H.; Baik, J. S.; Hyun, C. G.; Kim, S. S.; Lee, N. H., Anti-inflammatory Activities for the Extracts and Carpinotriols from Branches of *Carpinus turczaninowii*. *International Journal of Pharmacology* **2013**, 9 (2), 157-163.
80. Lee, J. S.; Kim, H. J.; Park, H.; Lee, Y. S., New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*. *Journal of Natural Products* **2002**, 65 (9), 1367-1370.
81. Inoshiri, S.; Sasaki, M.; Kohda, H.; Otsuka, H.; Yamasaki, K., Aromatic Glycosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry* **1987**, 26 (10), 2811-2814.
82. Smite, E.; Hefeng, P.; Lundgren, L. N., Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry* **1995**, 40 (1), 341-343.
83. Lee, M.-W.; Tanaka, T.; Nonaka, G.-I.; Hahn, D.-R., Phenolic Compounds on the Leaves of *Betula platyphylla* var. *latifolia*. *Archives of Pharmacal Research* **1992**, 15 (3), 211-214.
84. Suh, W. S.; Kim, K. H.; Kim, H. K.; Choi, S. U., Three New Lignan Derivatives from *Lindera glauca* (Siebold et Zucc.) Blume. *Helvetica Chimica Acta* **2015**, 98 (8), 1087-1094.
85. Szakiel, A.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Henry, M., Isolation and biological activities of lyonide from rhizomes and stems of *Vaccinium myrtillus*. *Phytochemistry Letters* **2011**, 4 (2), 138-143.
86. Lee, M. K.; Sung, S. H.; Lee, H. S.; Cho, J. H.; Kim, Y. C., Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Archives of Pharmacal Research* **2001**, 24 (3), 198-201.
87. Zhang, Y. X.; Xia, B.; Zhou, Y.; Ding, L. S.; Peng, S. L., Two new cyclic diarylheptanoids from the stems of *Ostryopsis nobilis*. *Chinese Chemical Letters* **2012**, 24 (6), 512-514.
88. Sung, S. H.; Lee, M., Anti-adipogenic activity of a new cyclic diarylheptanoid isolated from *Alnus japonica* on 3T3-L1 cells via modulation of PPAR, C/EBP α and SREBP1c signaling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25 (20), 4648-4651.
89. Marchal, A.; Cretin, B. N.; Sindt, L.; Waffo-Tégou, P.; Dubourdieu, D., Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification. *Tetrahedron* **2014**, 1-9.
90. Yang, Y.-L.; Chang, F.-R.; Wu, Y.-C., Squadinorlignoside: A Novel 7,9'-Dinorlignan from the Stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta* **2005**, 88, 2731-2737.
91. Hiltunen, E.; Pakkanen, T. T.; Avlila, L., Phenolic compounds in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Holzforschung* **2006**, 60, 519-527.
92. Dada, G.; Corbani, A., Lignan glycosides from the heartwood of european oak *Quercus petraea*. *Journal of Natural Products* **1989**, 52 (6), 1327-1330.
93. Lee, D. G.; Jung, H. J.; Woo, E. R., Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3 α -O- β -D-Glucopyranoside isolated from the root bark of *Lycium chinense* Miller against human pathogenic microorganisms. *Archives of Pharmacal Research* **2005**, 28, 1031-1036.
94. Thongphasuk, P.; Suttisri, R.; Bavovada, R.; Verpoorte, R., Antioxidant lignan glucosides from *Strychnos vanprukii*. *Fitoterapia* **2004**, 75 (7-8), 623-628.

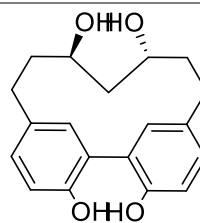
95. Matsuda, H.; Ishikado, A.; Nishida, N.; Ninomiya, K.; Fujiwara, H.; Kobayashi, Y.; Yoshikawa, M., Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of the aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 2939-2944.
96. Inatani, R.; Nakatani, N.; Fuwa, H., Antioxidative Effect of the Constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Their Derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry* **1983**, *47* (3), 521-528.
97. Muneharu, O.; Sueo, H.; Isao, I., Studies on the Constituents of *Enkianthus nudipes*. III. A New Phenolic Glucoside from the Stems. *Yakugaku Zasshi* **1973**, *93* (2), 223-223.
98. Wang, Y.; Zhu, H.; Wang, D.; Cheng, R.; Yang, C.; Xu, M.; Zhang, Y., A New Phloroglucinol Glucoside from the Whole Plants of *Glochidion eriocarpum*. *Korean Chemical Society* **2014**, *35* (2), 631-634.
99. Li, Y. X.; Yu, X.; Yu, S. J.; Ma, A. Y.; Deng, Z. W.; Lin, W. H., Phenolic glucopyranosides from the Chinese mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* **2010**, *19*, 256-259.
100. Fuchino, H.; Satoh, T.; Tanaka, N., Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. I. Constituents of *Betula ermanii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1995**, *43* (11), 1937-1942.
101. Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Yamasaki, K., Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. *Phytochemistry* **551-556**, *59*, 551-556.
102. Kitagawa, I.; Wei, H.; Nagao, S.; Mahmud, T.; Hori, K.; Kobayashi, M.; Uji, T.; Shibuya, H., Indonesian Medicinal Plants. XIV. Characterization of 3'-O-Caffeoylsweroside, a New Secoiridoid Glucoside, and Kelampayosides A and B, Two New Phenolic Apiogluconides, from the Bark of *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *44* (6), 1162-1167.
103. Xu, Y. J.; Foubert, K.; Dhooghe, L.; Lemièrre, F.; Cimanga, K.; Mesia, K.; Apers, S.; Pieters, L., Chromatographic profiling and identification of two new iridoid-indole alkaloids by UPLC-MS and HPLC-SPE-NMR analysis of an antimalarial extract from *Nauclea pobeguinii*. *Phytochemistry Letters* **2012**, *5* (2), 316-319.
104. Ko, H. N.; Kim, J. M.; Bu, H. J.; Lee, N. H., Chemical Constituents from the Branches of *Carpinus turczaninowii* with Antioxidative Activities. *Journal of the Korean Chemical Society* **2013**, *57* (4), 520-524.
105. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 5421-5426.
106. Girard-Lalancette, K.; Pichette, A.; Legault, J., Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry* **2009**, *115*, 720-726.
107. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (10), 4619-4626.
108. Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Grenon, C.; Dussault, C.; Pichette, A., Antioxidant Activity, Inhibition of Nitric Oxide Overproduction, and *In Vitro* Antiproliferative Effect of Maple Sap and Syrup from *Acer saccharum*. *Journal of Medicinal Food* **2010**, *13* (2), 460-468.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LISTE DES MOLECULES ISOLEES DE L'EAU DE DEROUlage LORS DES TRAVAUX PRELIMINAIRES

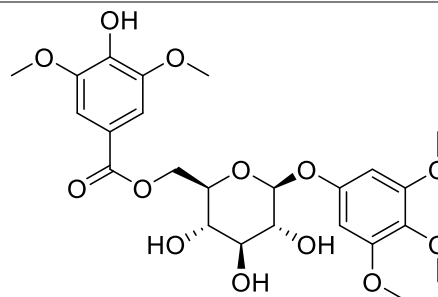
Nom	Type de molécule	Structure
Kelampayoside A	Glycoside phénolique	
Carpinontriol A	Diarylheptanoïde cyclique	
Betulatetraol	Diarylheptanoïde cyclique	
Smiglabranol xyloside	Glycoside phénolique (nouveau)	

Lyoniside	Lignane	
Nudiposide	Lignane	
Lyoniresinol glucoside	Lignane	
Smiglabranol glucoside	Glycoside phénolique (nouveau)	
Betuladiol glucoside	Diarylheptanoïde cyclique (nouveau)	
Alnusdiol	Diarylheptanoïde cyclique	

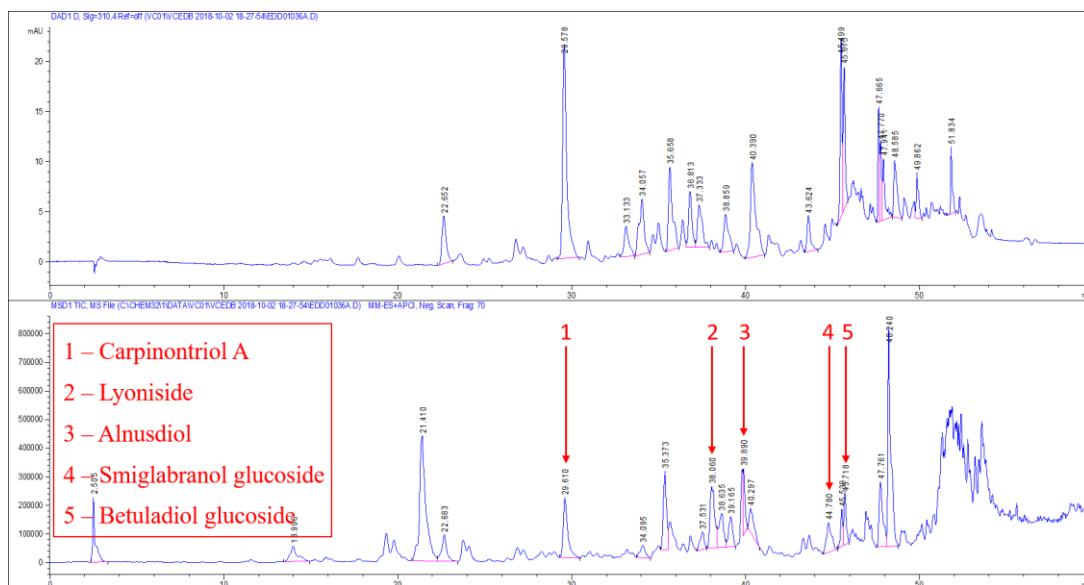


3,4,5-trimethoxyphenyl-6-O-syringoyl- β -D-glucopyranoside

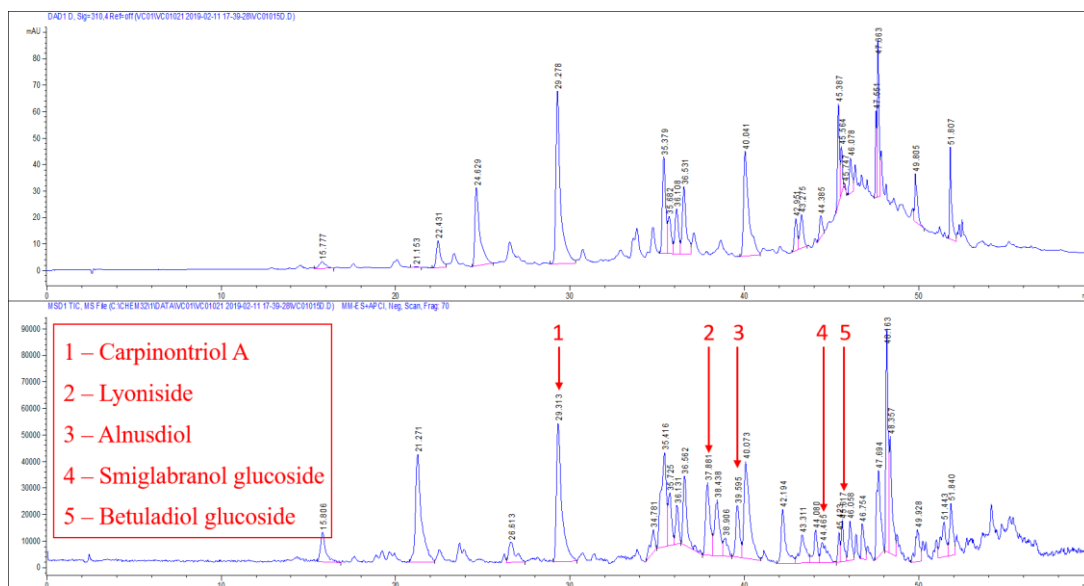
Glycoside
phénolique



ANNEXE 2 : COMPARAISON DES CHROMATOGRAMMES HPLC-MS DE L'EXTRAIT BRUT PRODUIT AU MÉTHANOL (A) ET A L'ÉTHANOL (B)

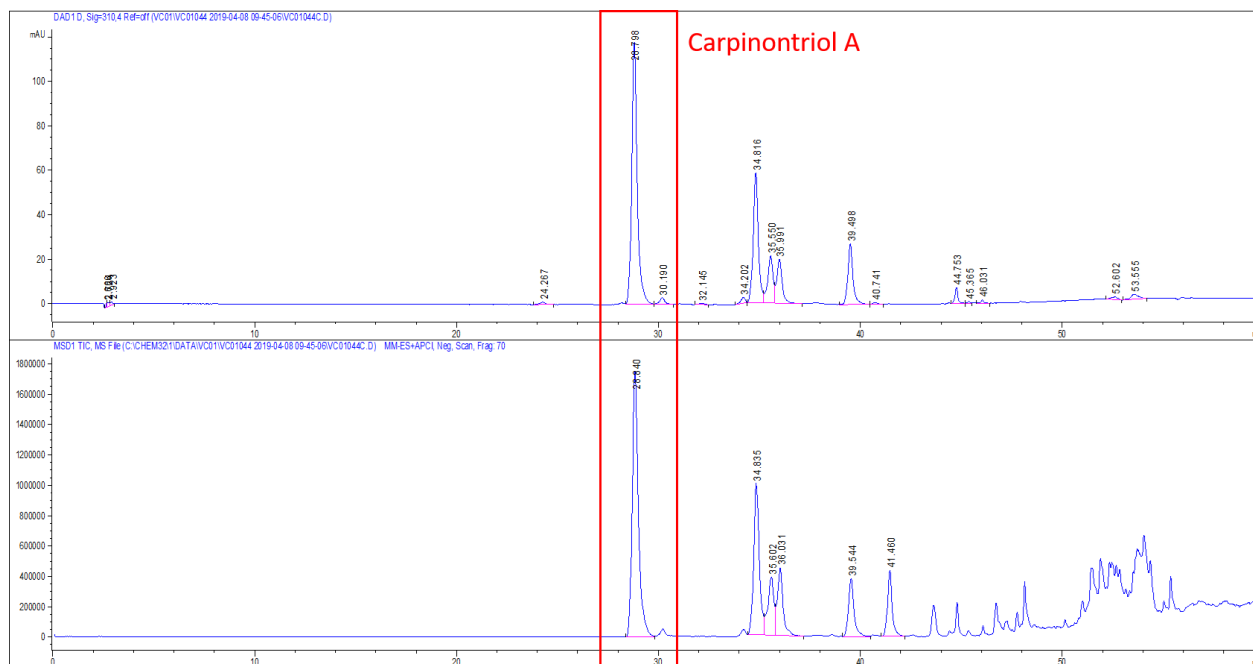


A) Chromatogramme HPLC-MS (UV : 310 nm) de l'extrait brut produit au méthanol. Conditions : phase mobile MeOH-H₂O colonne biphenyl ; 10 à 50 % MeOH à t = 40 min, 50 à 100 % MeOH à t = 50 min. Débit 1 mL/min, volume d'injection 10 µL



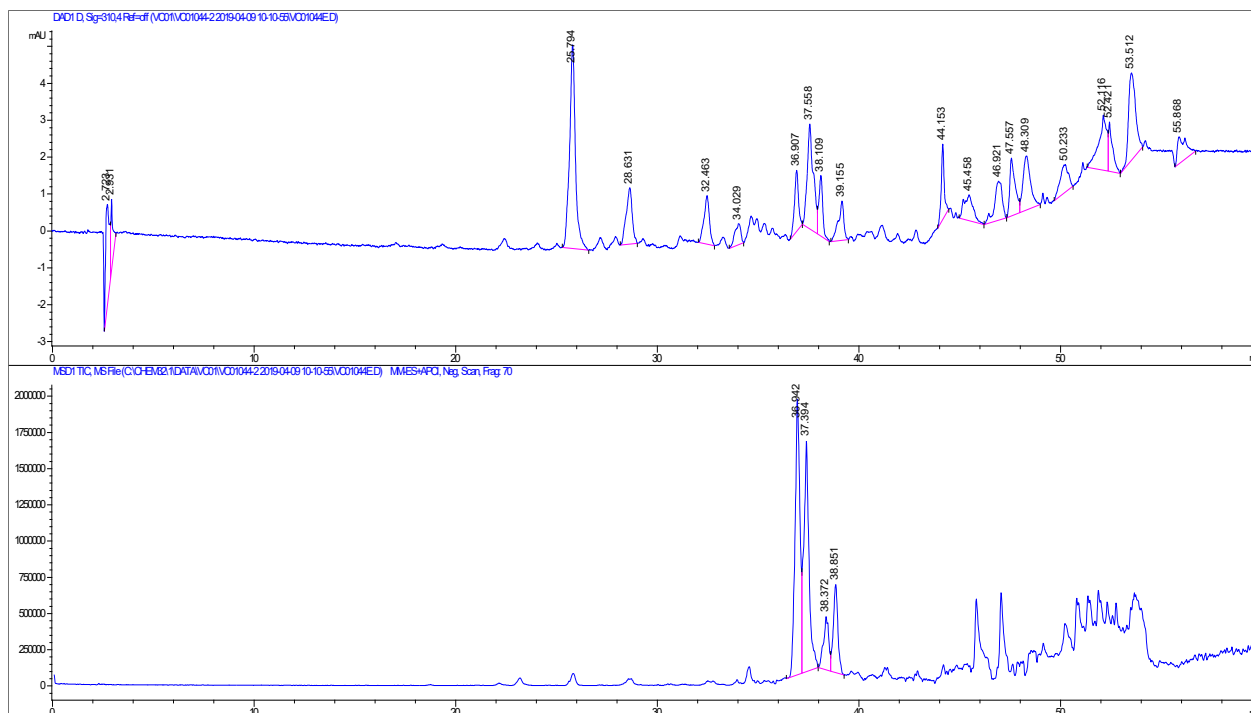
B) Chromatogramme HPLC-MS (UV : 310 nm) de l'extrait brut produit à l'éthanol. Conditions : phase mobile MeOH-H₂O colonne biphenyl ; 10 à 50 % MeOH à t = 40 min, 50 à 100 % MeOH à t = 50 min. Débit 1 mL/min, volume d'injection 10 µL

ANNEXE 3 : FRACTION D4 ENRICHIÉ EN CARPINONTRIOL A

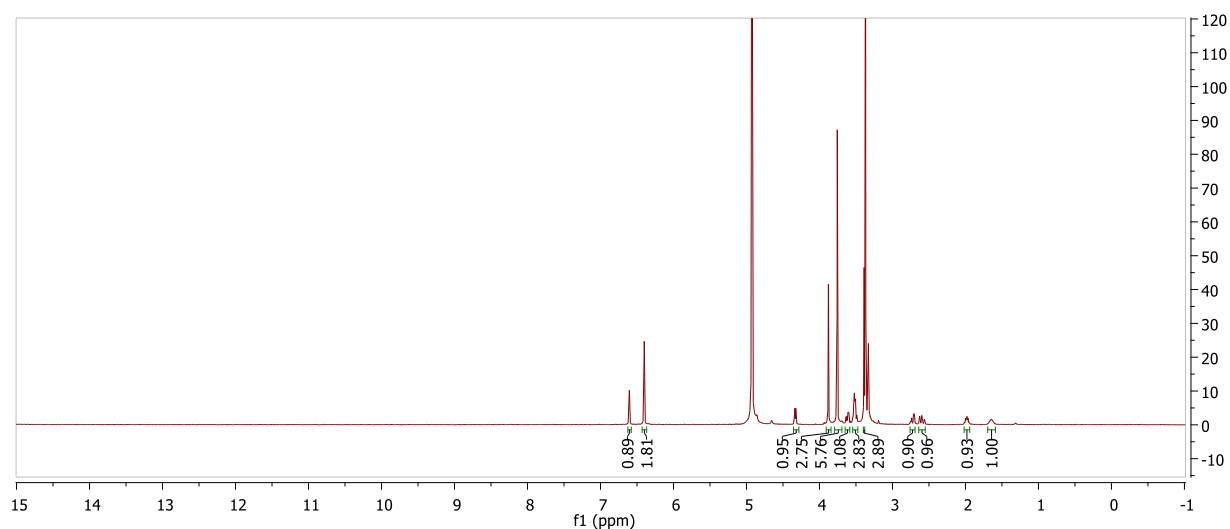
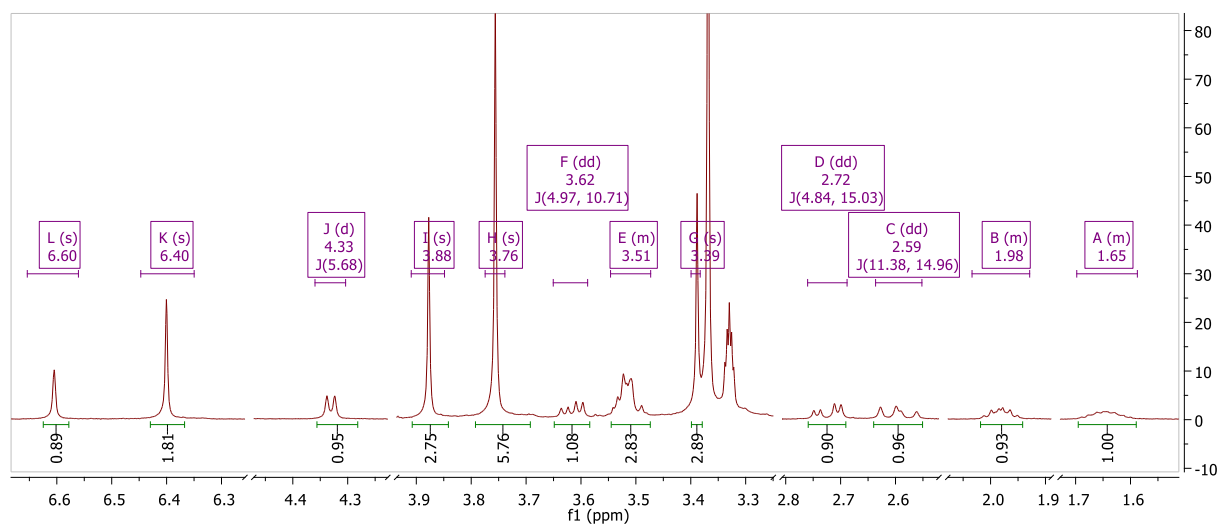


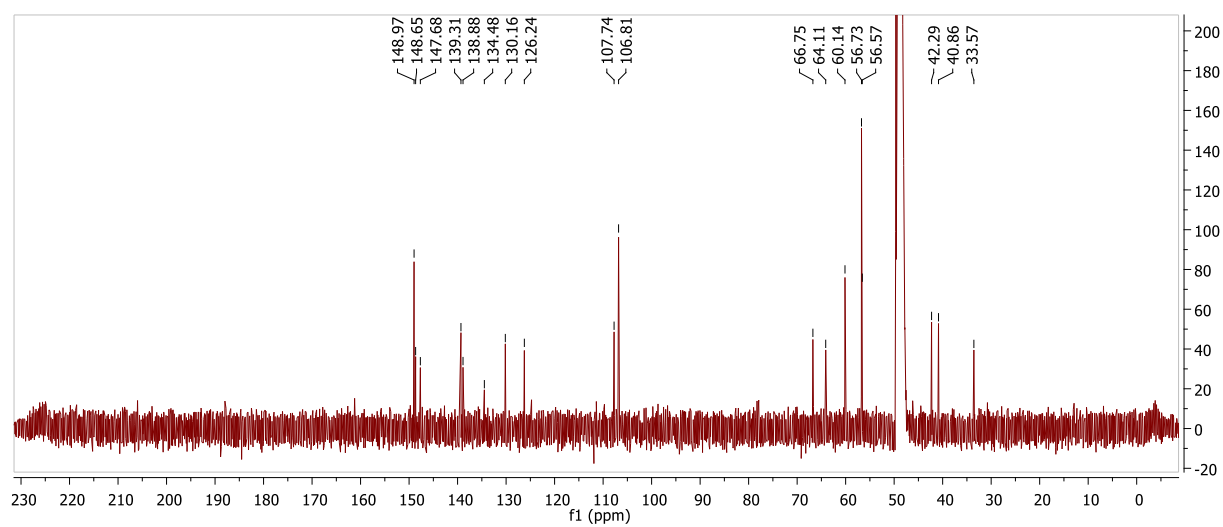
Chromatogramme HPLC-MS (UV : 310 nm) de la fraction D4 enrichie en carpinontriol A. Conditions : phase mobile MeOH-H₂O colonne biphenyl ; 10 à 50 % MeOH à t = 40 min, 50 à 100 % MeOH à t = 50 min. Débit 1 mL/min, volume d'injection 10 µL

ANNEXE 4 : FRACTION D6

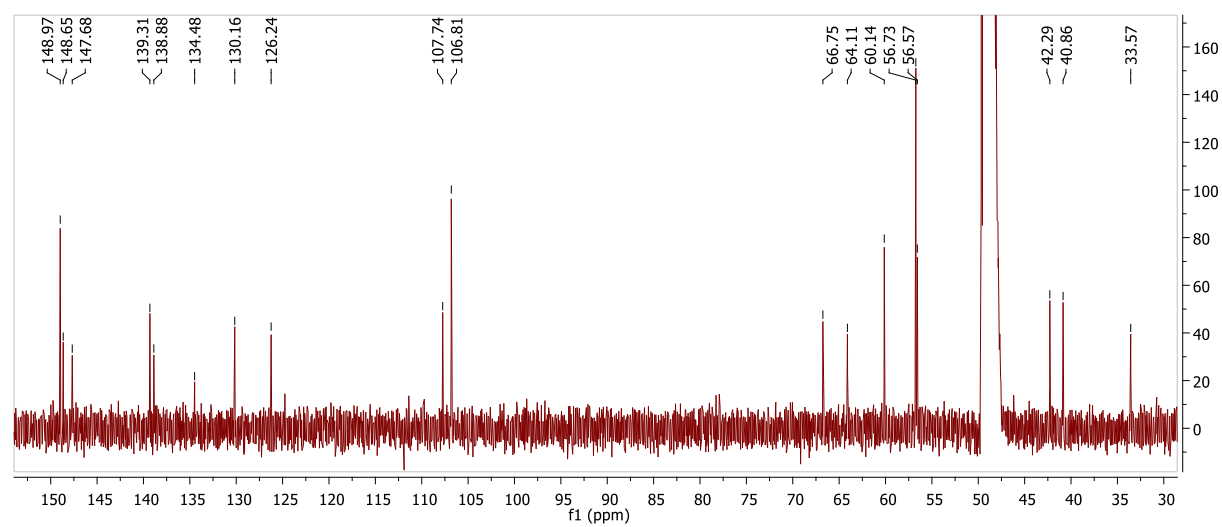


Chromatogramme HPLC-MS (UV : 310 nm) de la fraction D6. Conditions : phase mobile MeOH-H₂O colonne biphenyl ; 10 à 50 % MeOH à t = 40 min, 50 à 100 % MeOH à t = 50 min. Débit 1 mL/min, volume d'injection 10 µL

ANNEXE 5 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 16 (LYONIRESINOL)Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 16Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 16

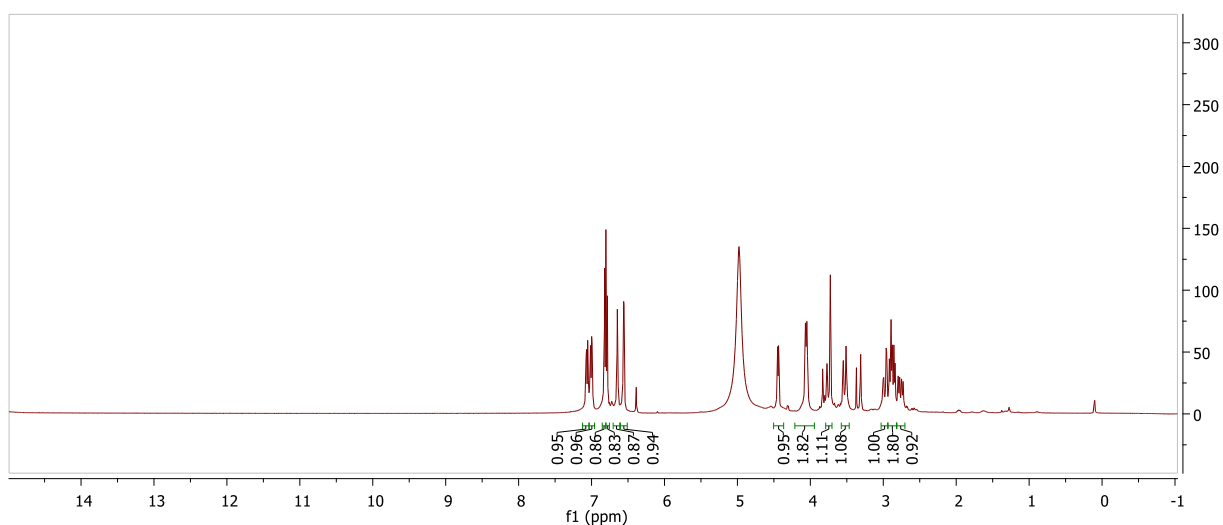


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **16**

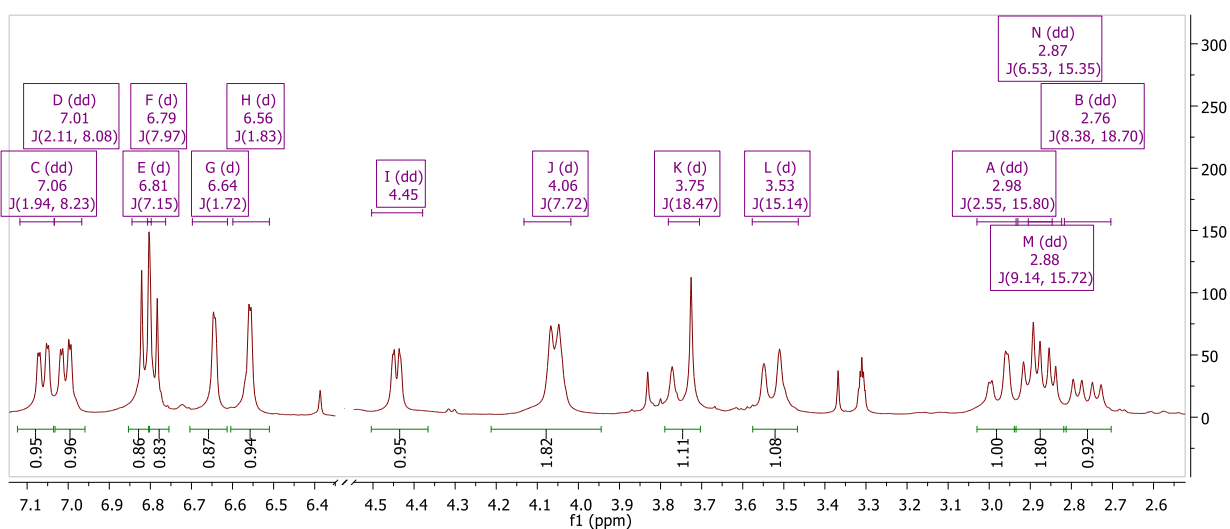


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **16**

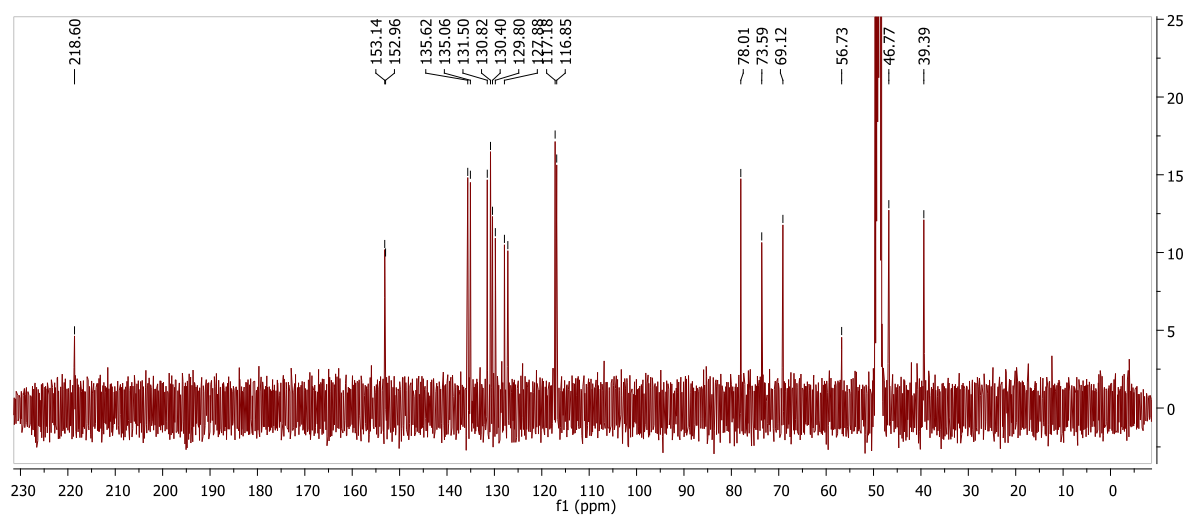
ANNEXE 6 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 2 (CARPINONTRIOL A)



Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 2

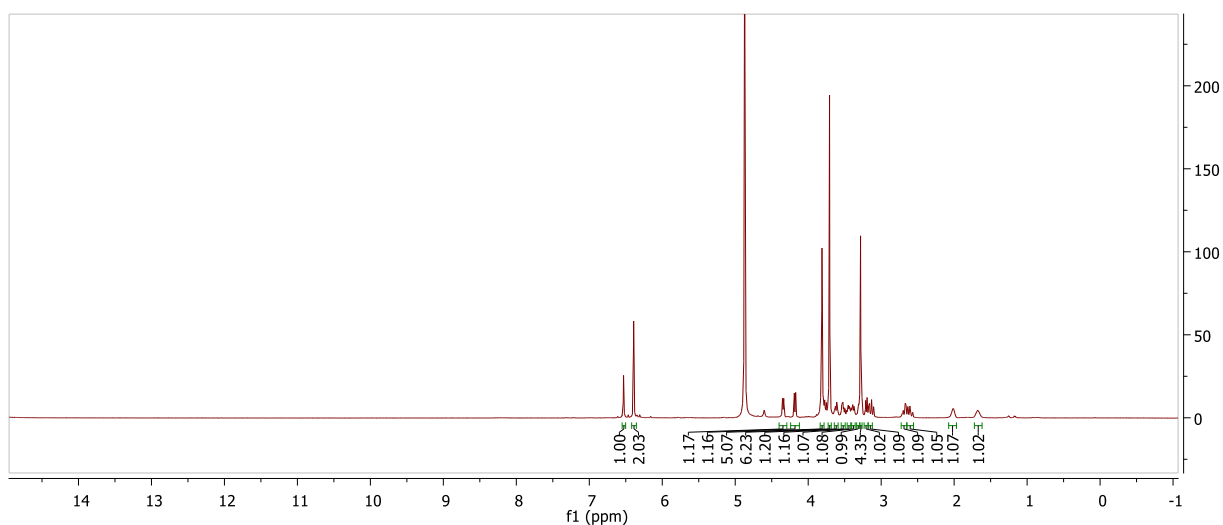


Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 2

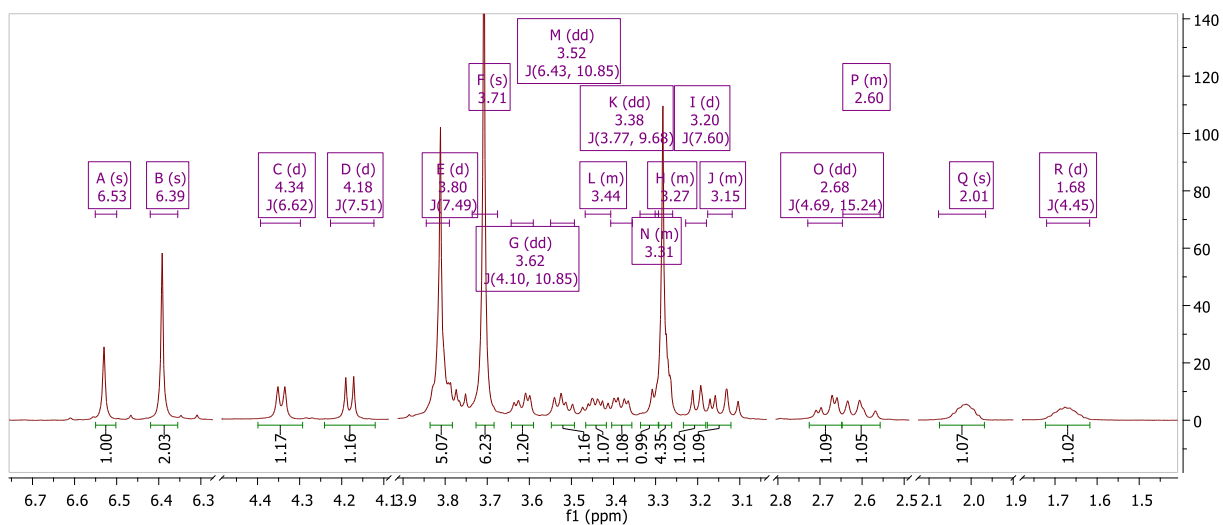


Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) de **2**

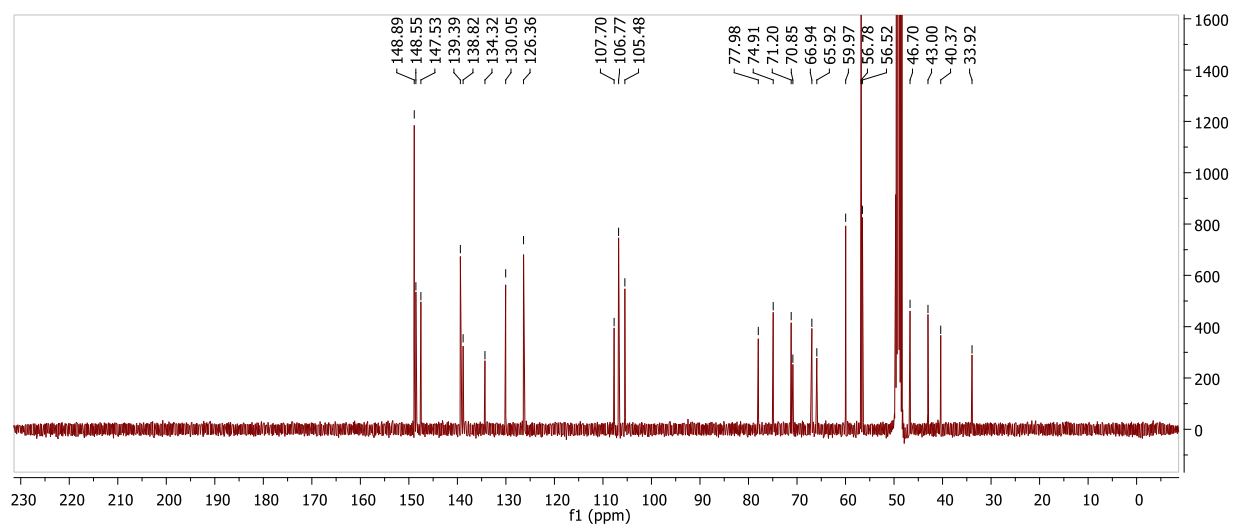
ANNEXE 7 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 5 (LYONISIDE)



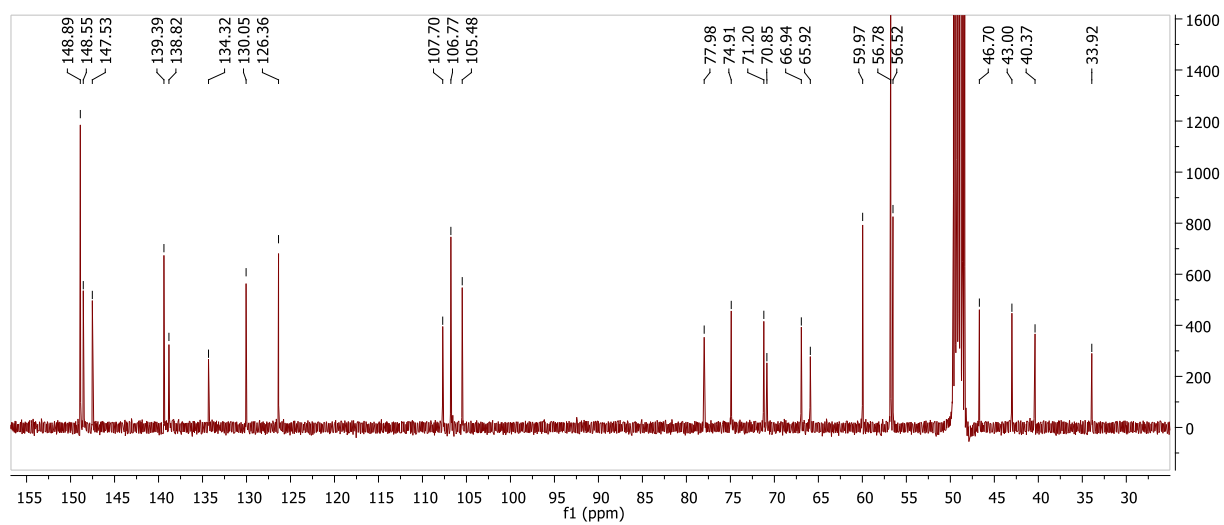
Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 5



Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 5

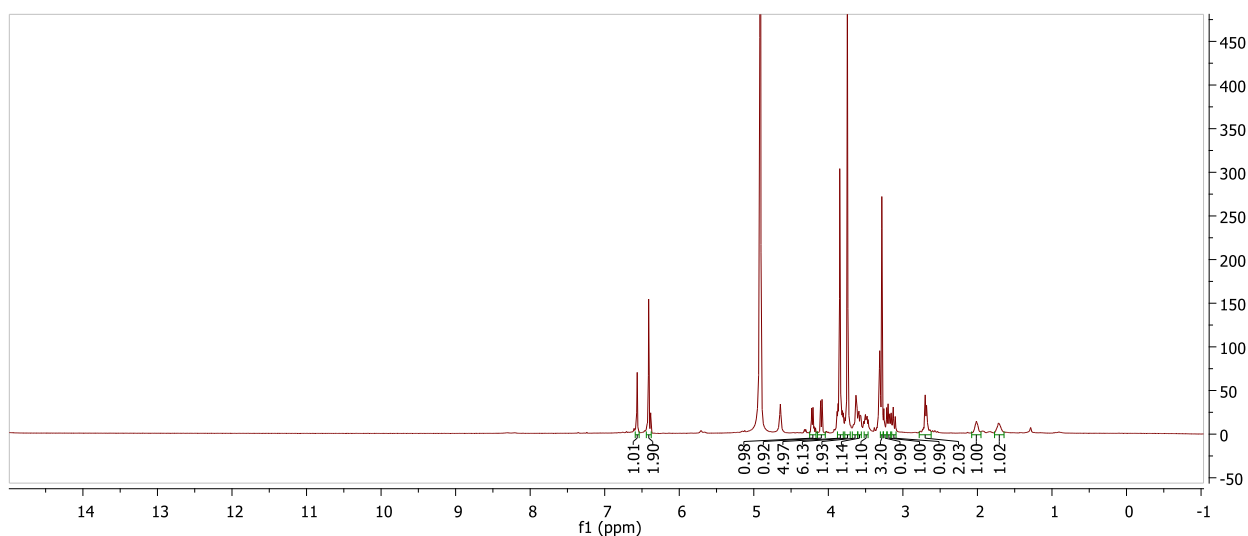


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de 5

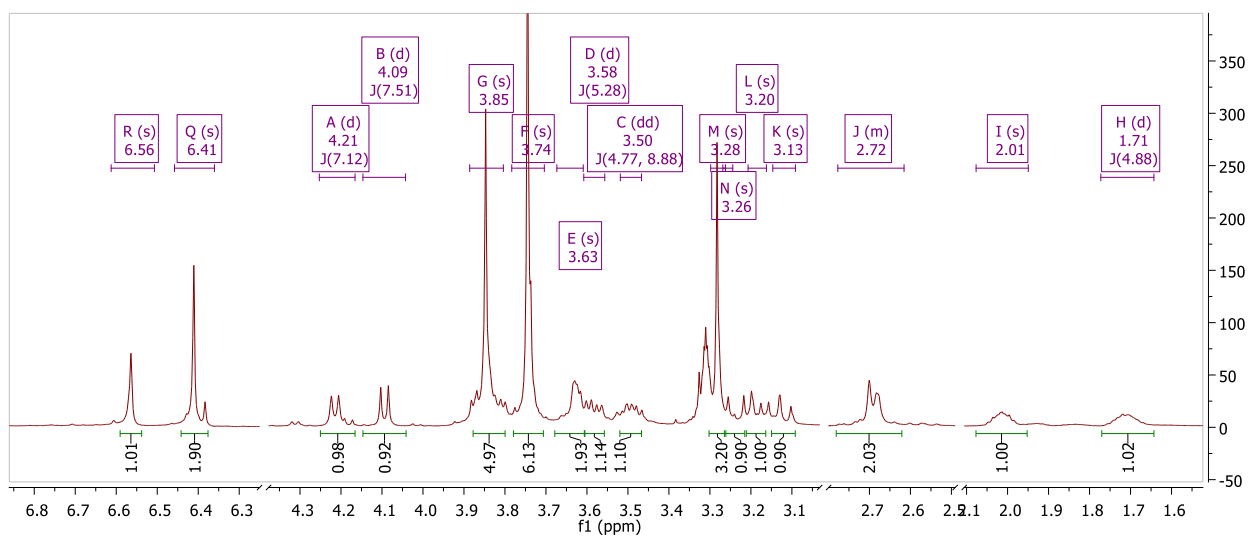


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de 5

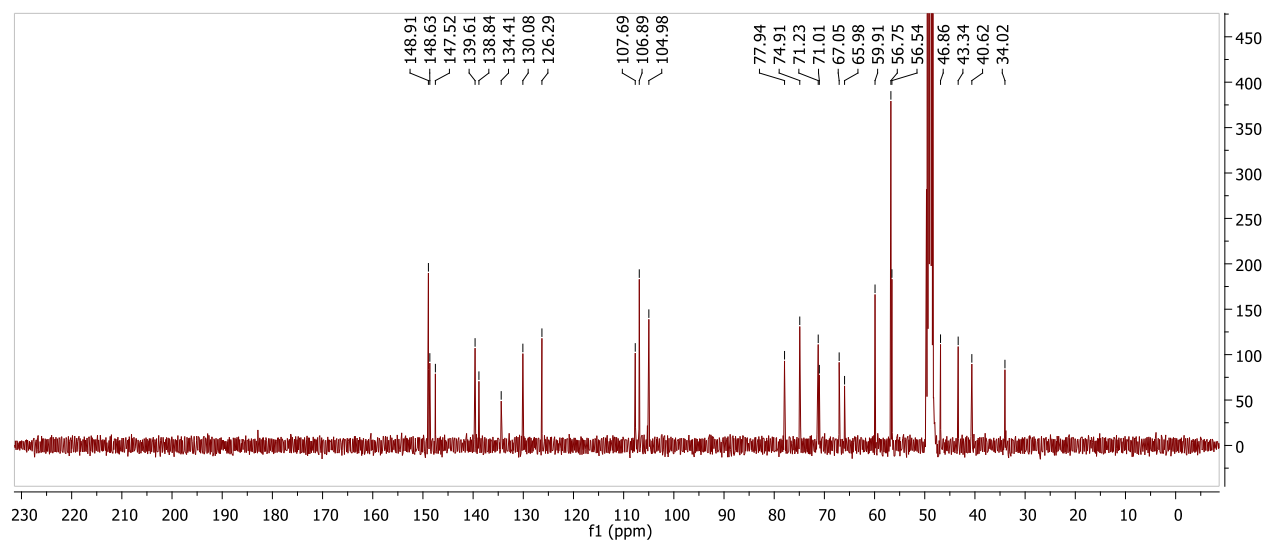
ANNEXE 8 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 6 (NUDIPOSIDE)



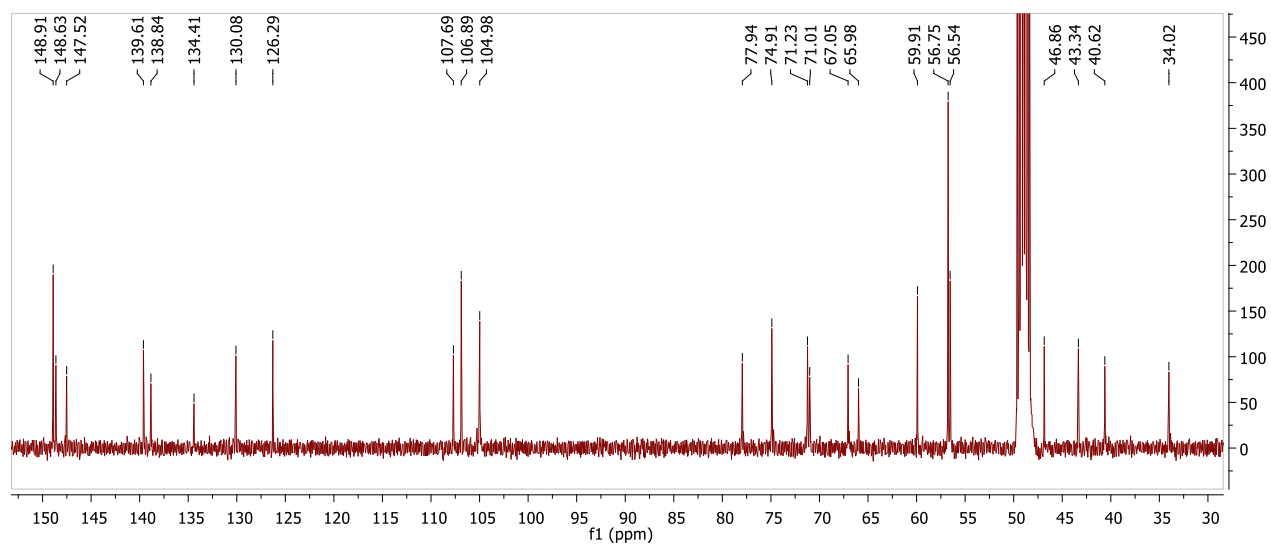
Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 6



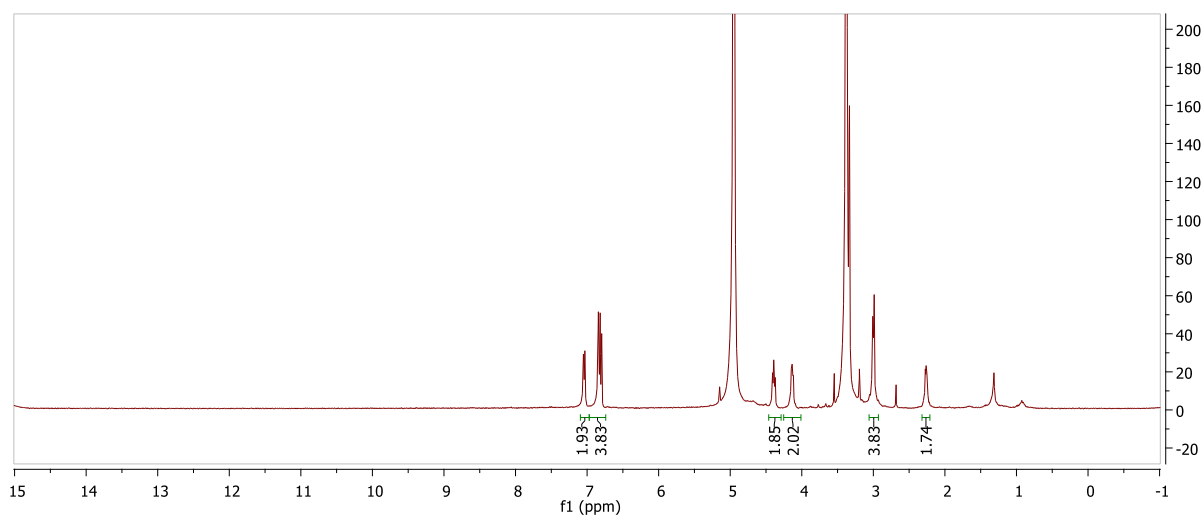
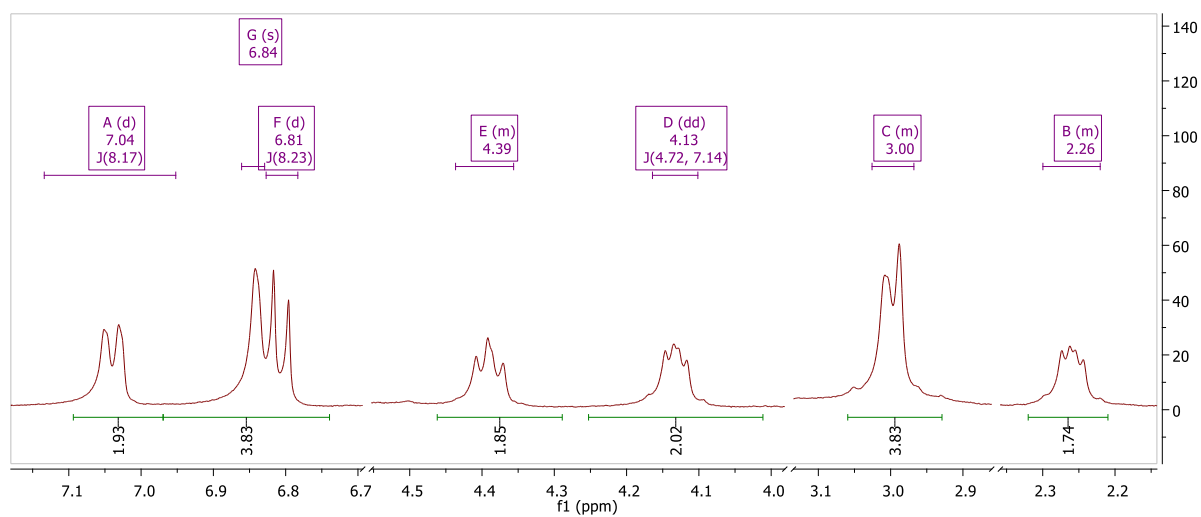
Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 6

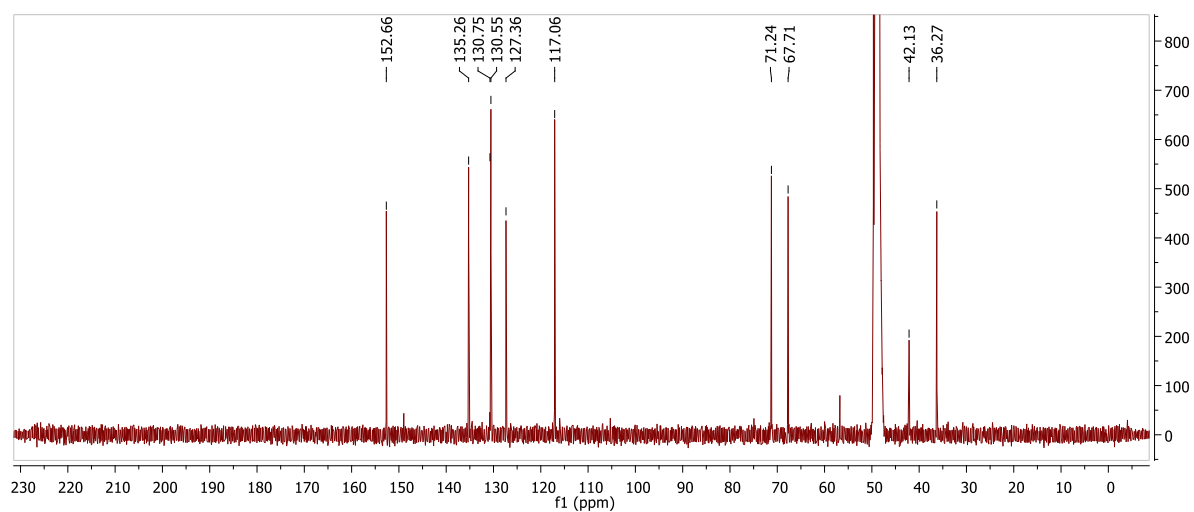


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **6**

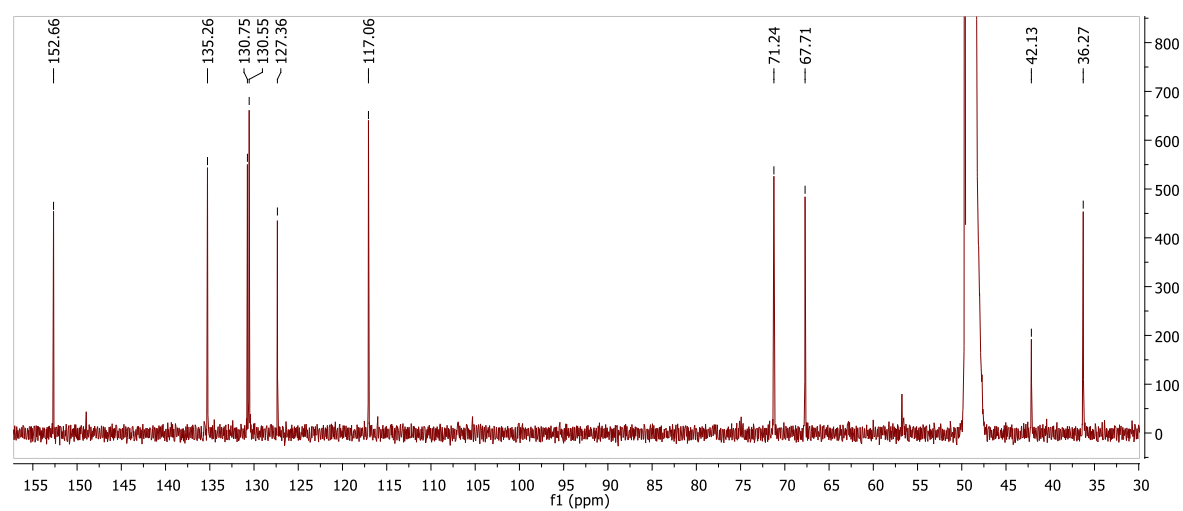


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **6**

ANNEXE 9 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 3 (BETULATETRAOL)Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 3Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 3

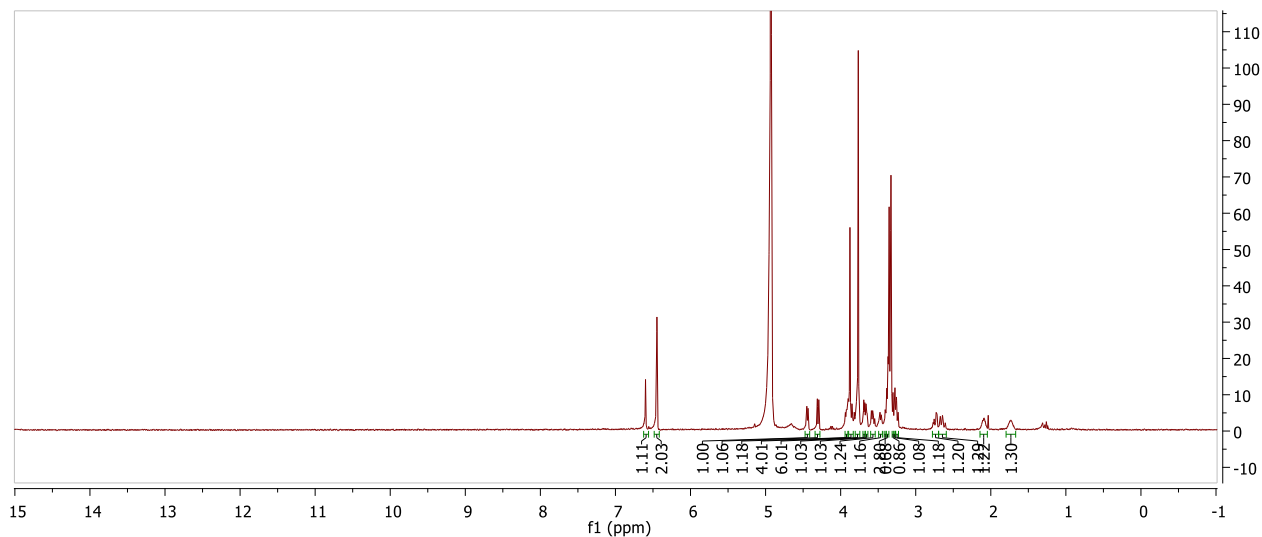


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **3**

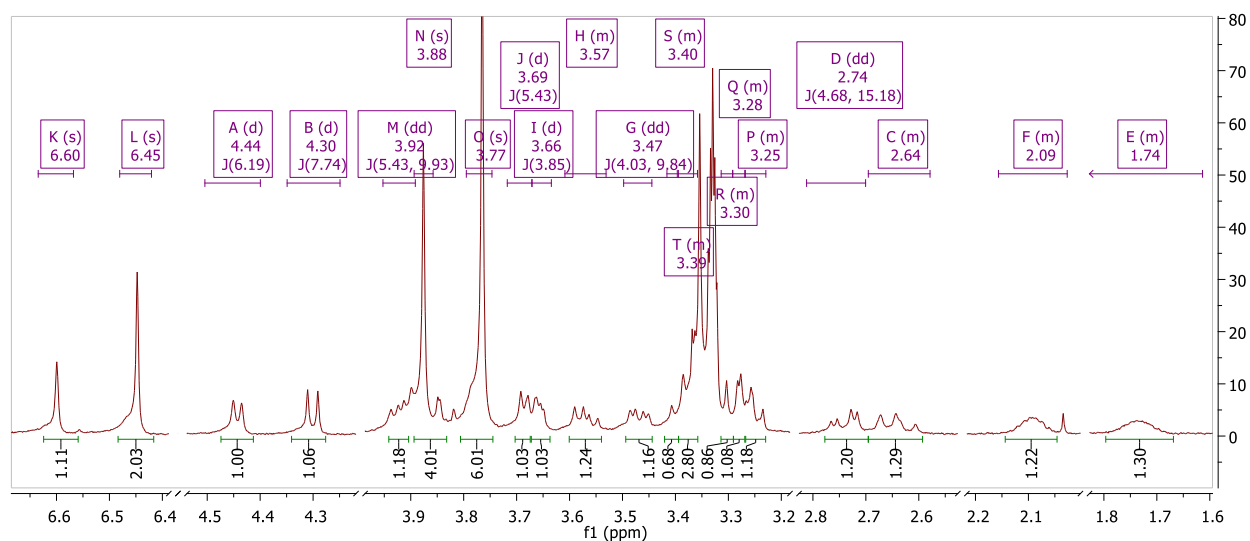


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **3**

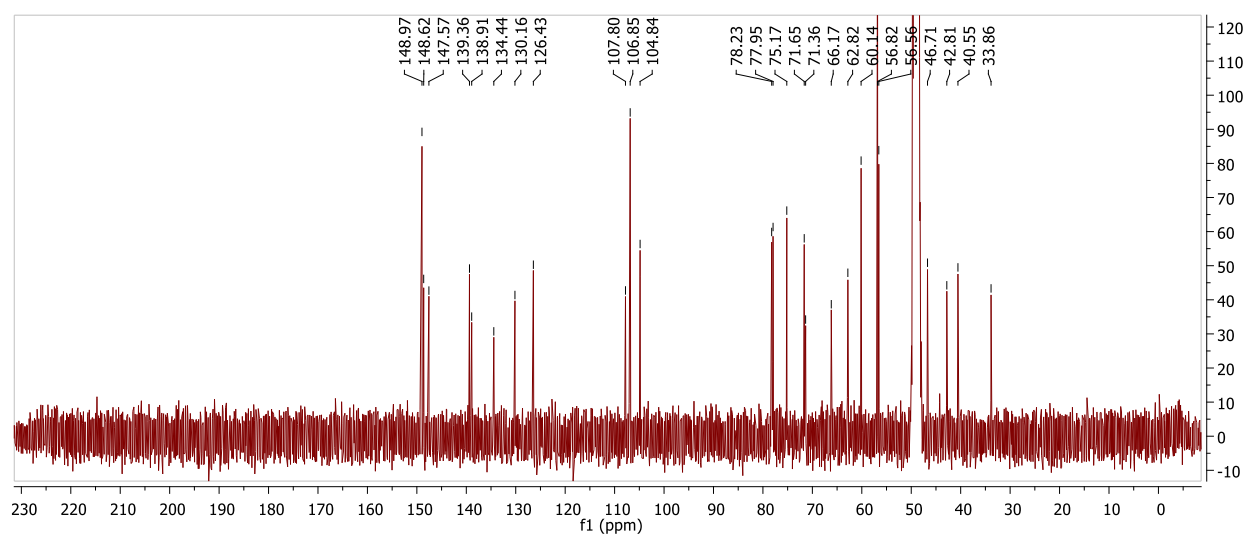
ANNEXE 10 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 7 (GLUCOSIDE DE LYONIRESINOL)



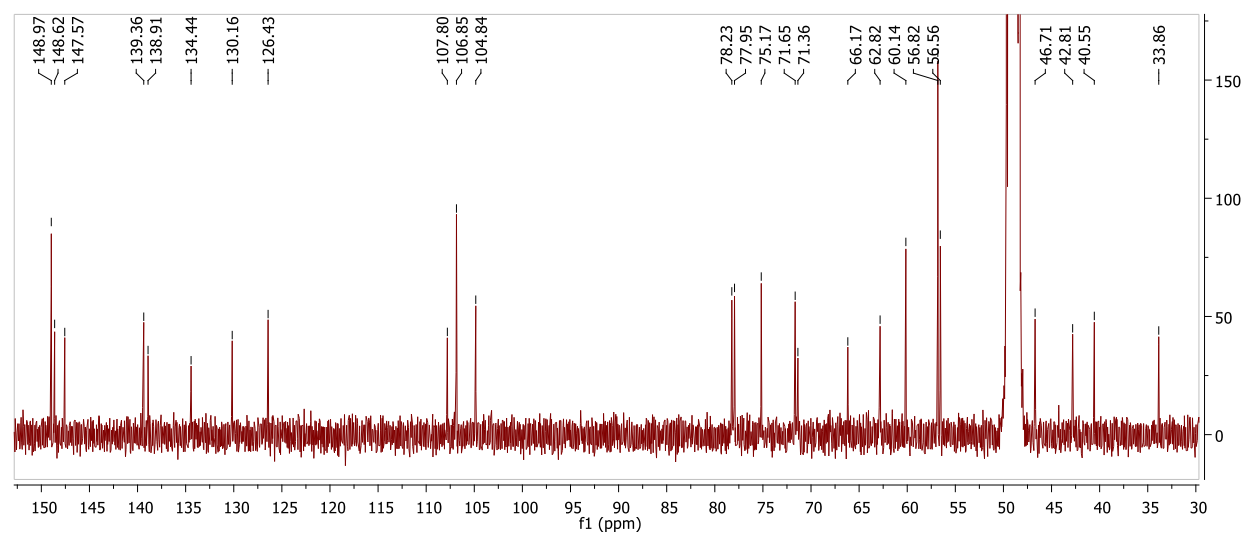
Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 7



Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 7

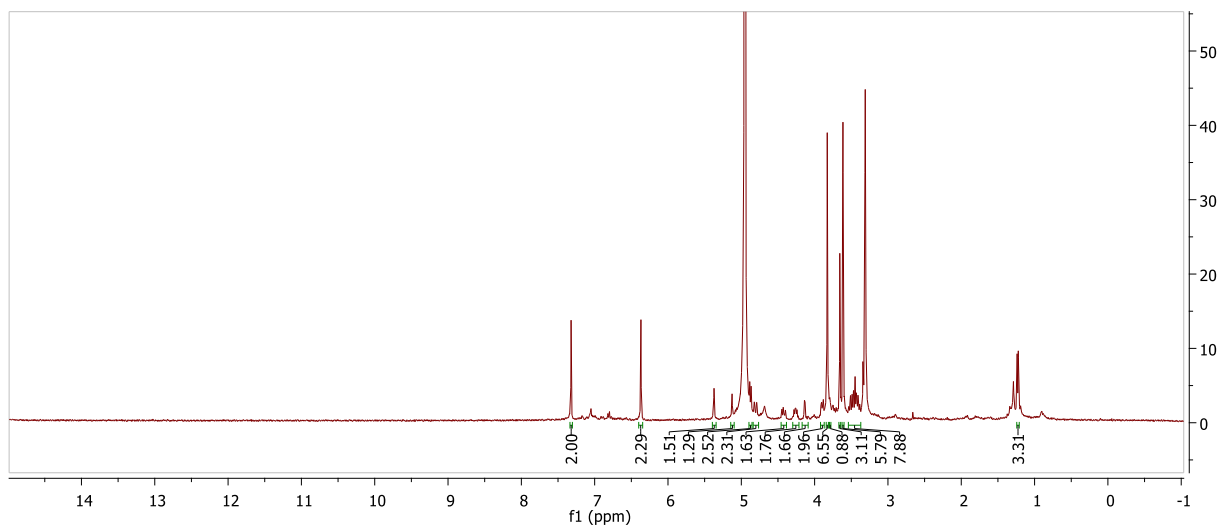


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **7**

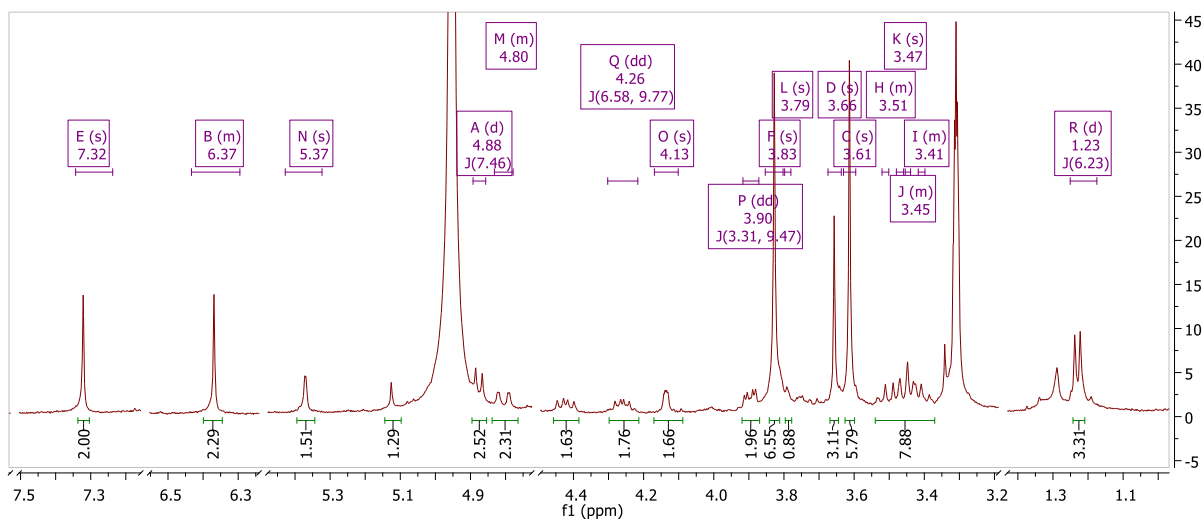


Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **7**

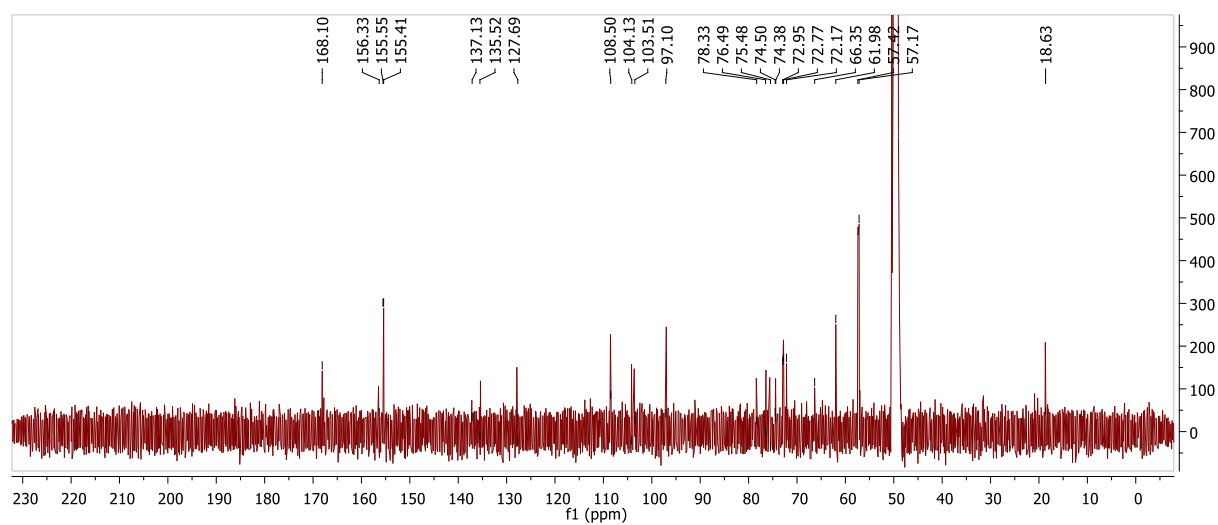
ANNEXE 11 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 19 (RHAMNOSIDE DE TRIMETHOXYPHENYL SYRINGOYL GLUCOSE)



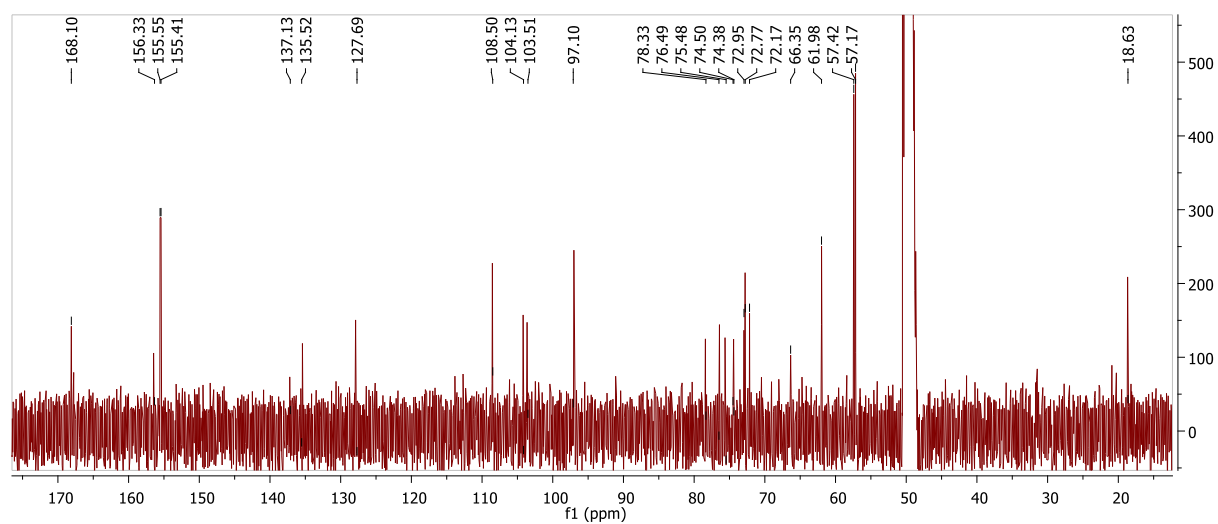
Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 19



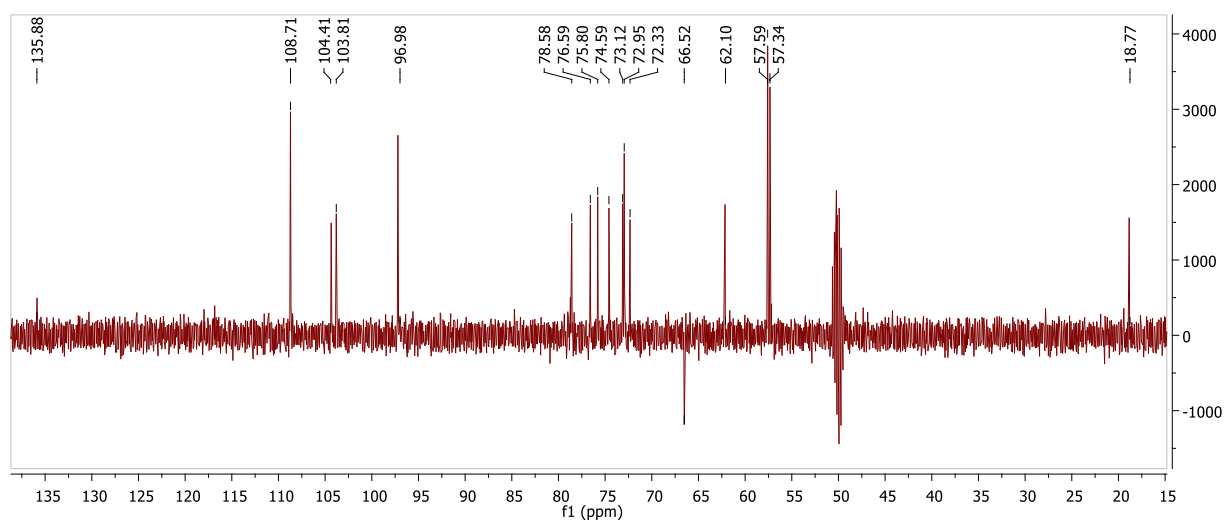
Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 19



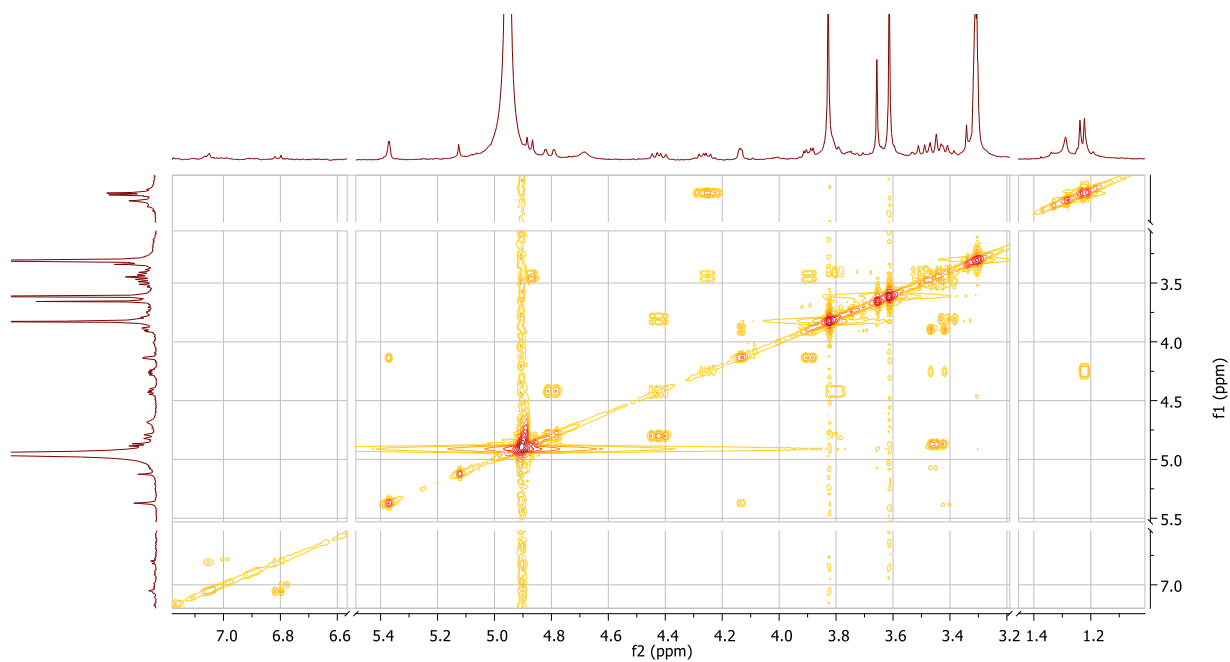
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **19**



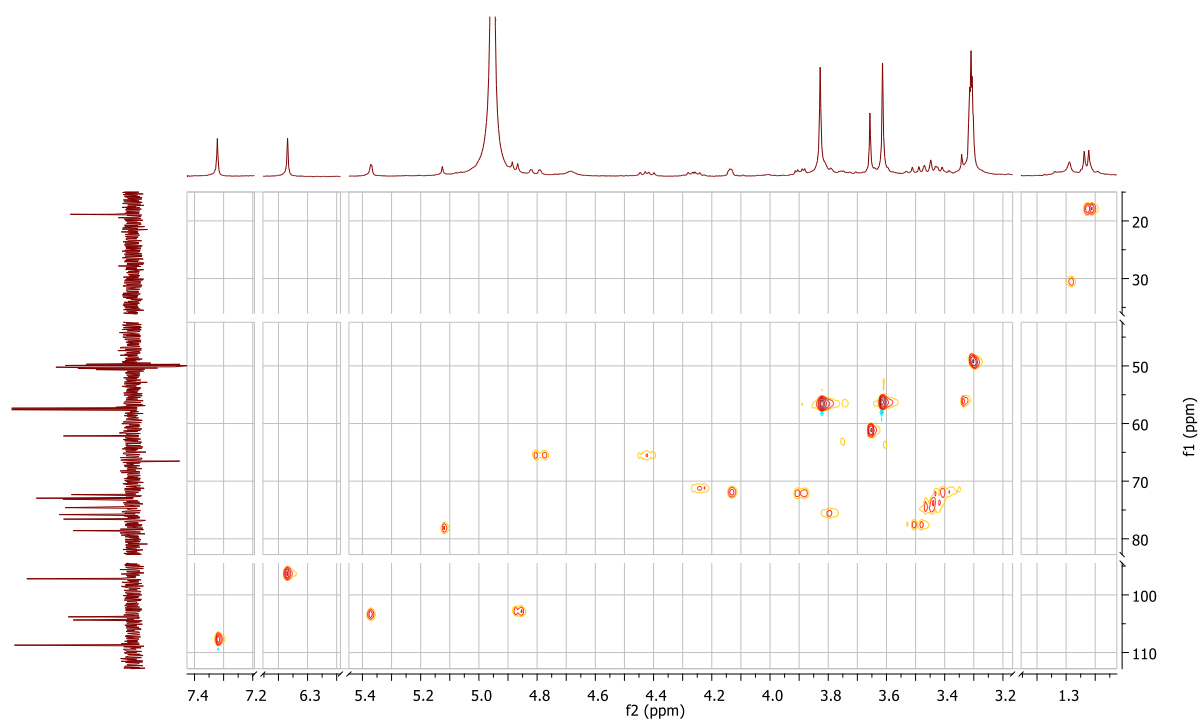
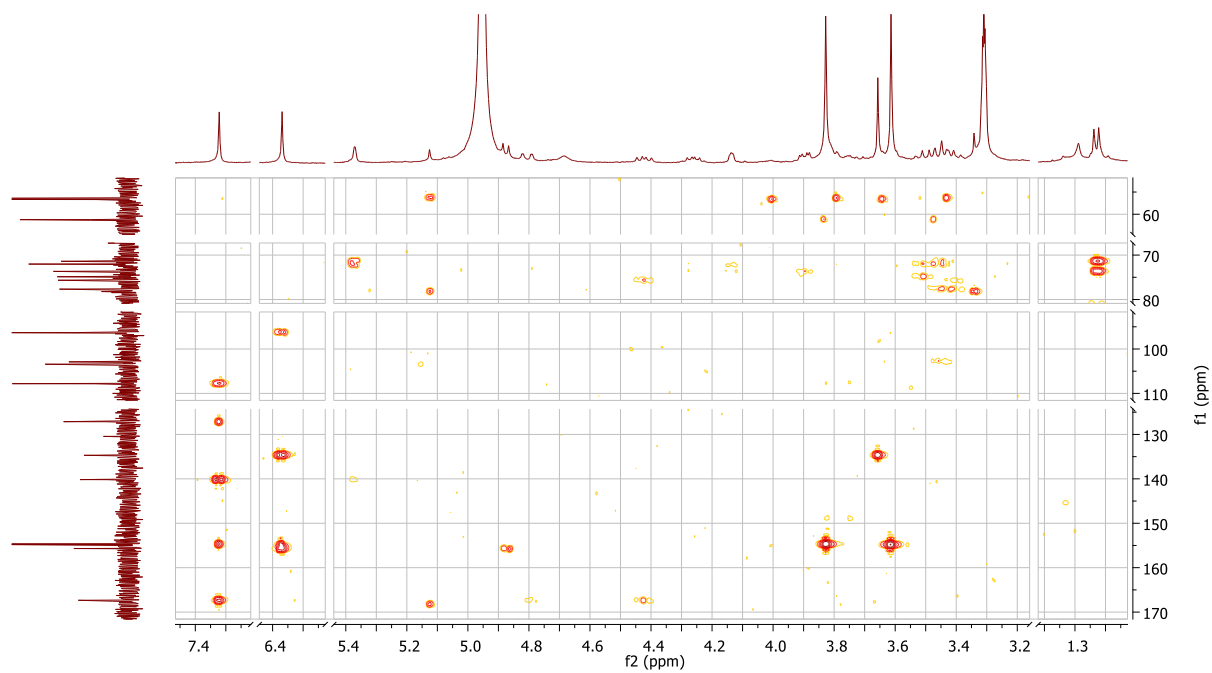
Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **19**



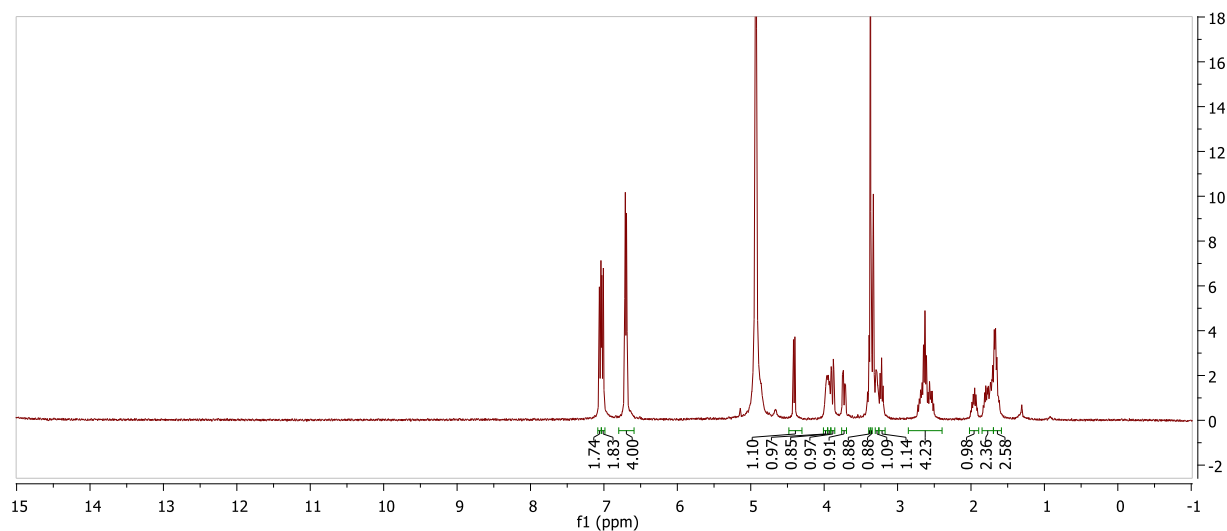
Agrandissement du spectre DEPT135 de **19**



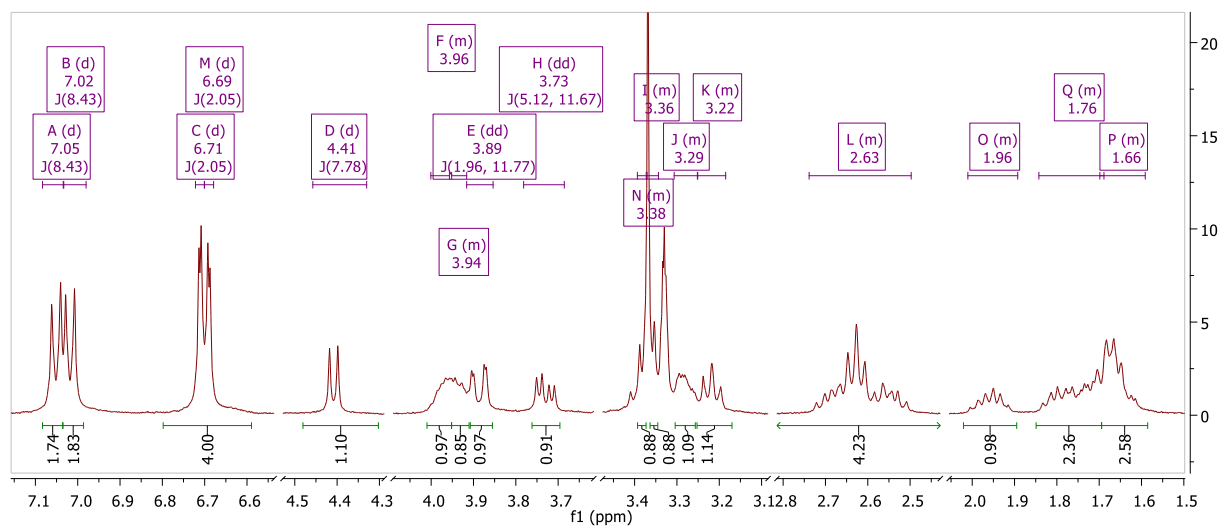
Agrandissement du spectre COSY de **19**

Agrandissement du spectre HSQC de **19**Agrandissement du spectre HMBC de **19**

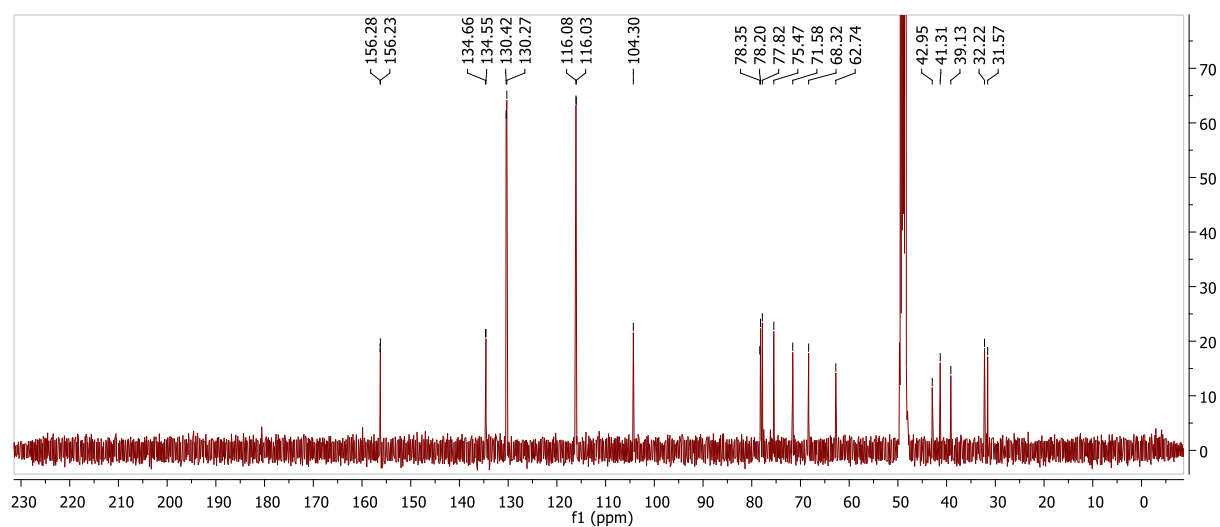
ANNEXE 12 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 20 (GLUCOSIDE D'HANNOKINOL)



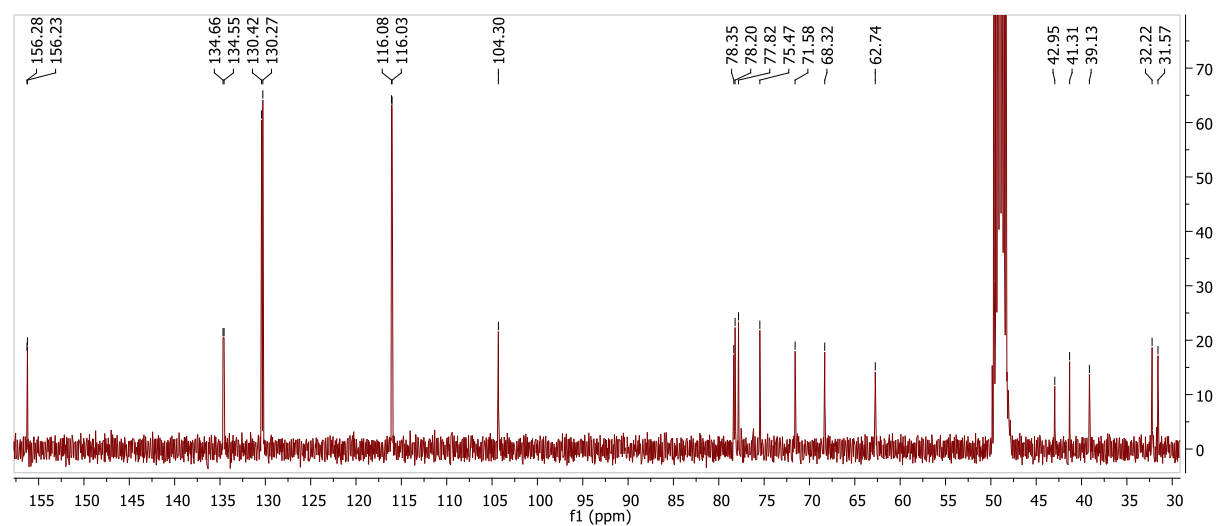
Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 20



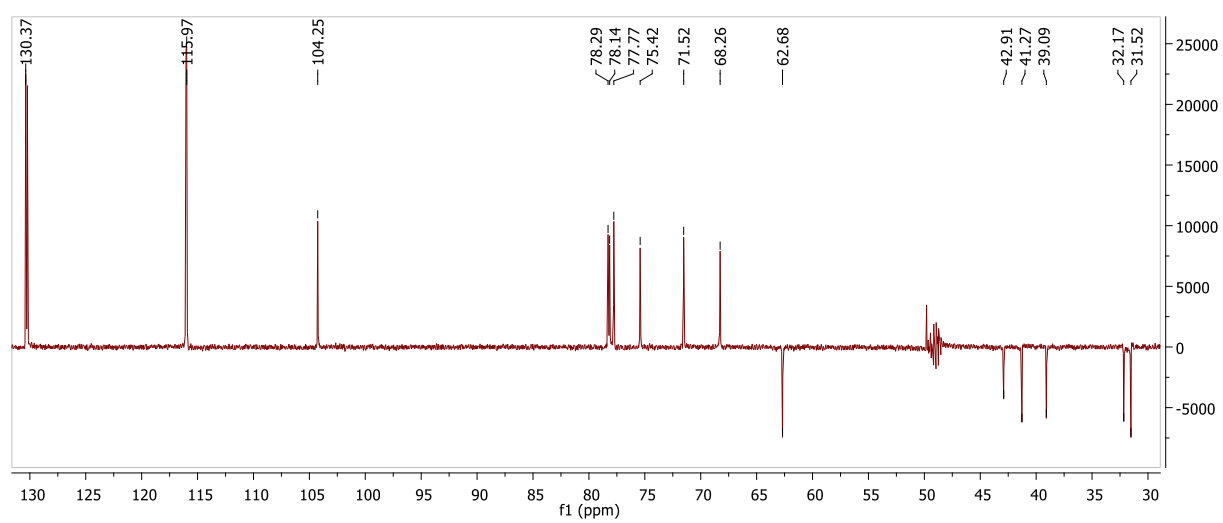
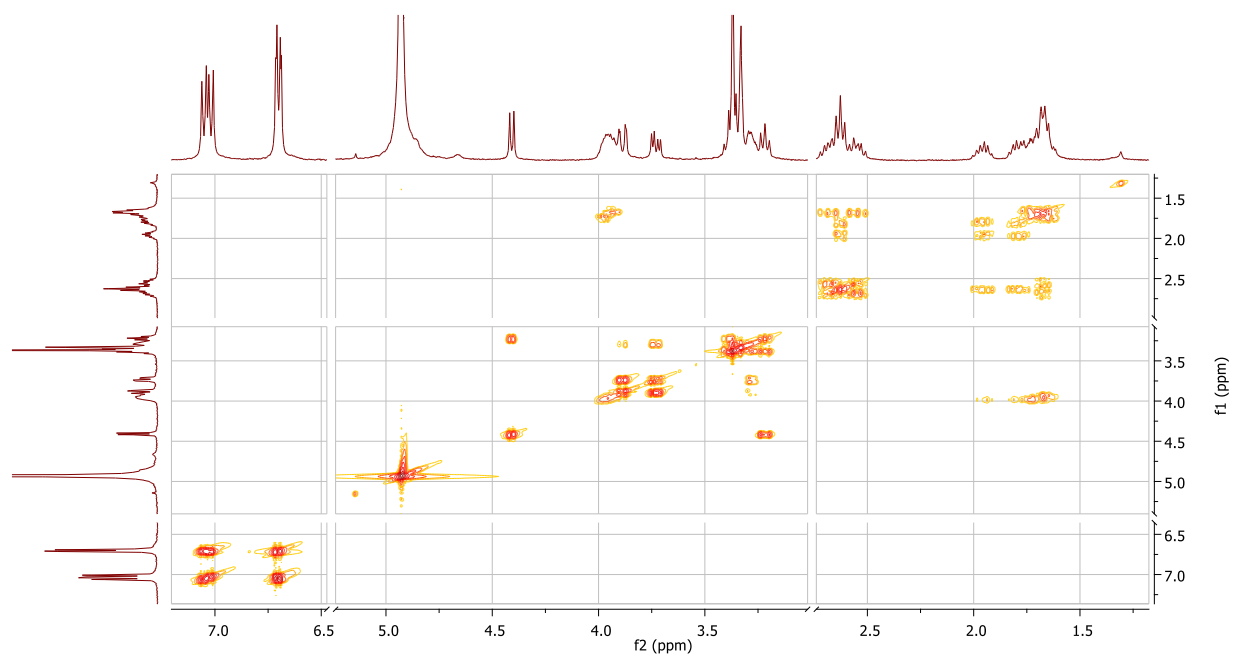
Agrandissement du spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) de 20

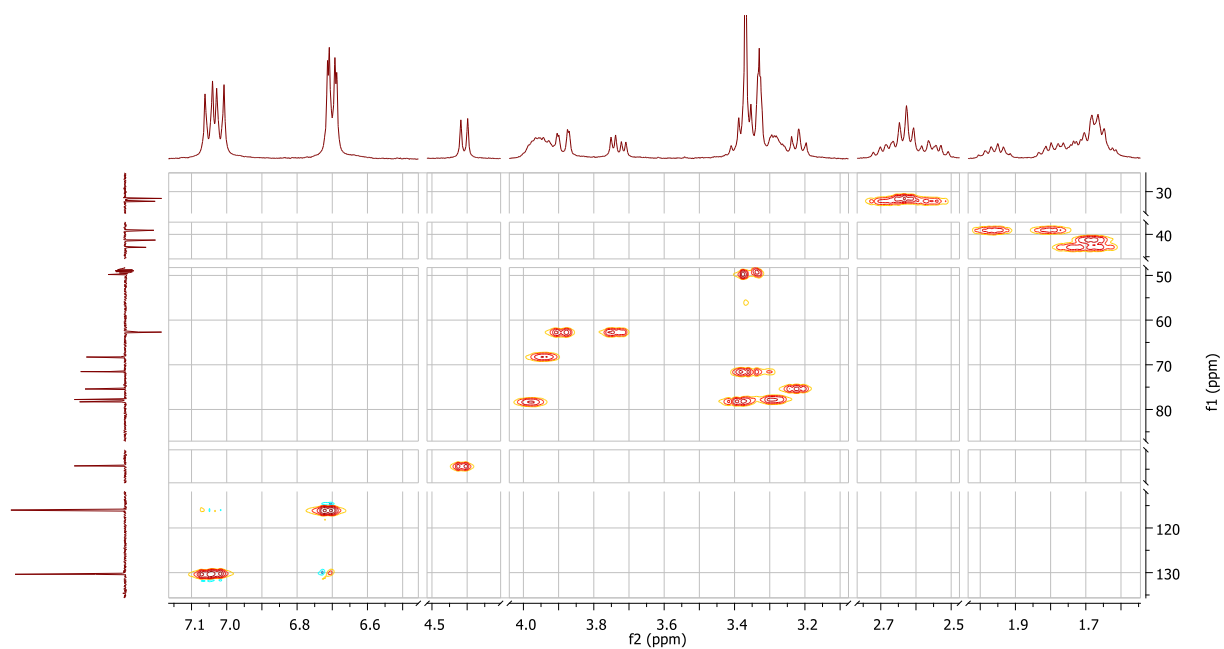


Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) de **20**

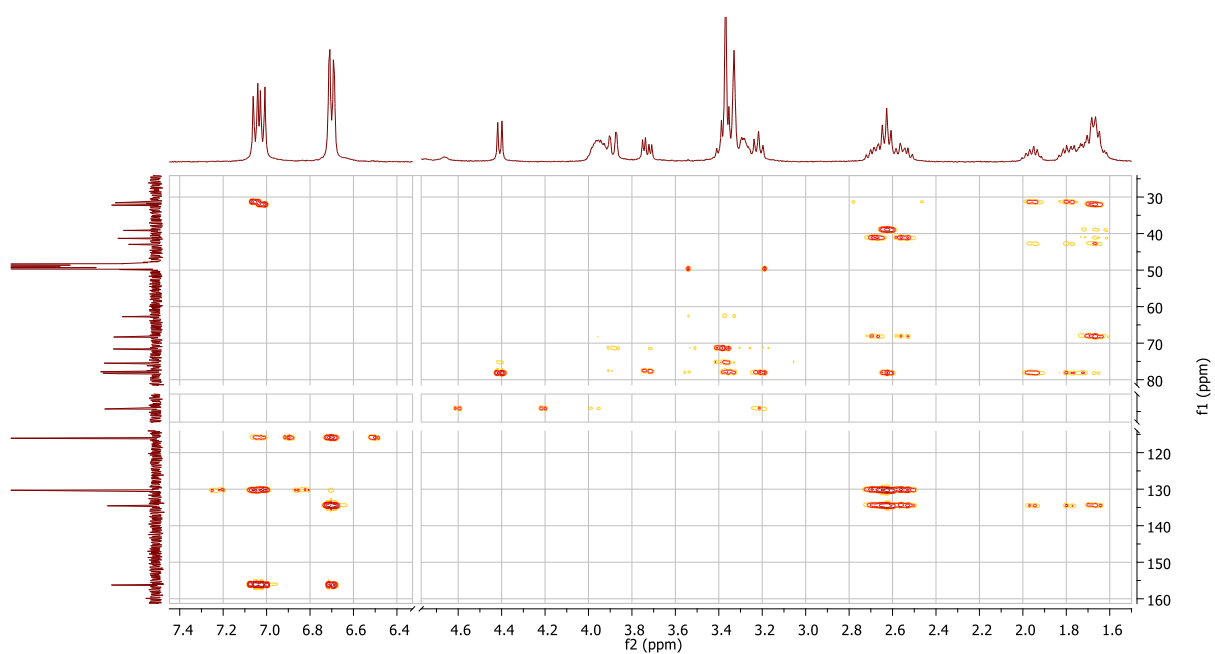


Agrandissement du spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) de **20**

Agrandissement du spectre DEPT135 de **20**Agrandissement du spectre COSY de **20**

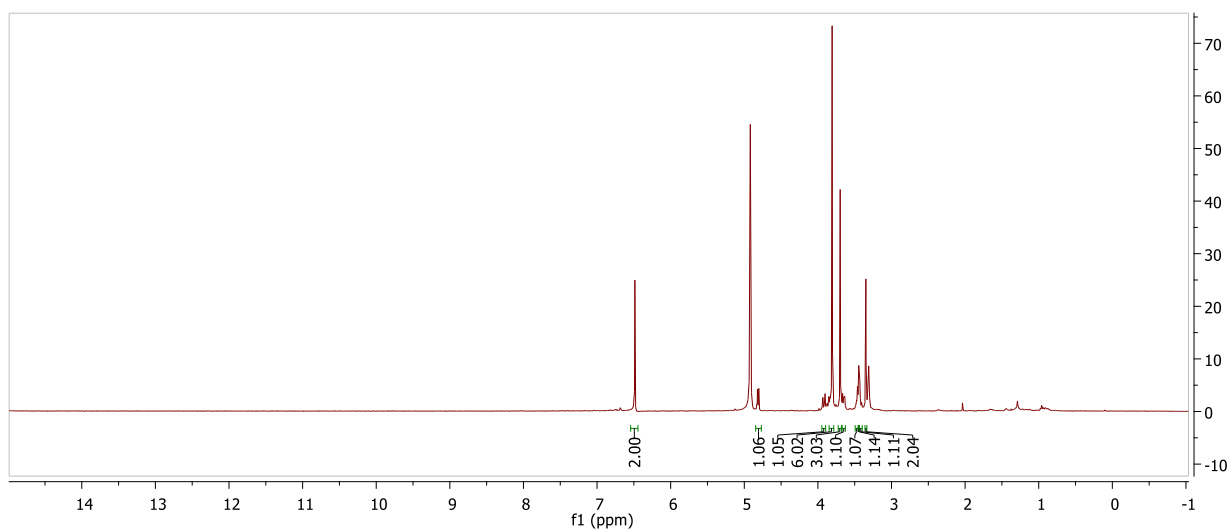


Agrandissement du spectre HSQC de **20**

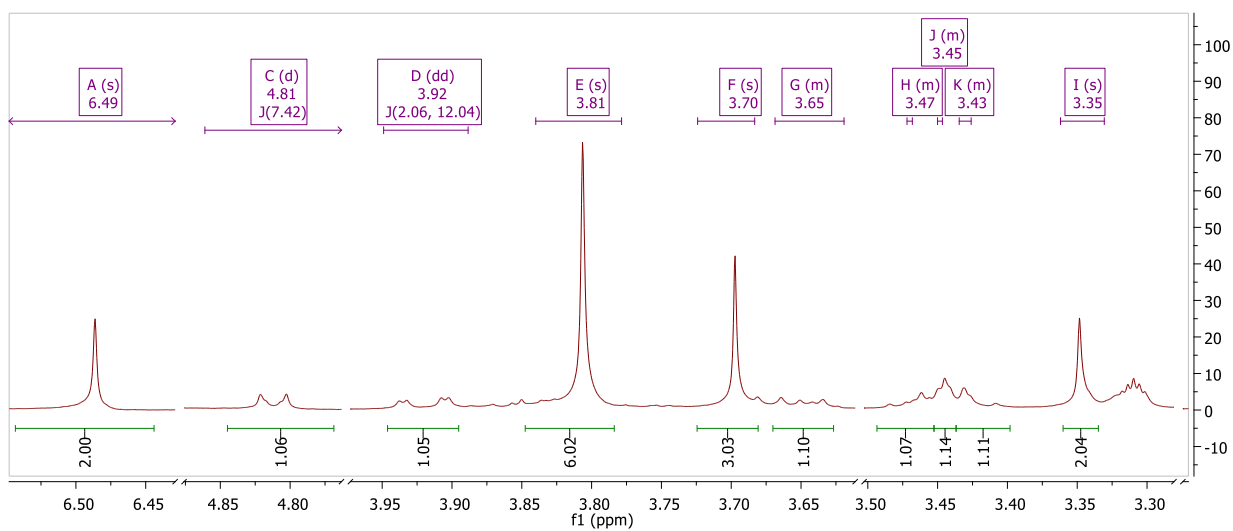


Agrandissement du spectre HMBC de **20**

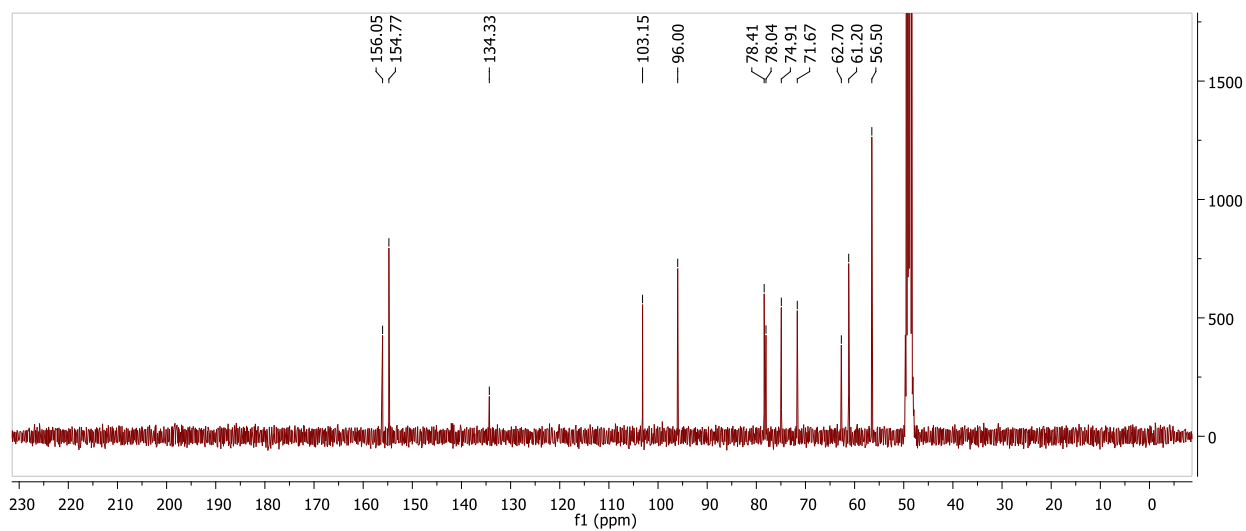
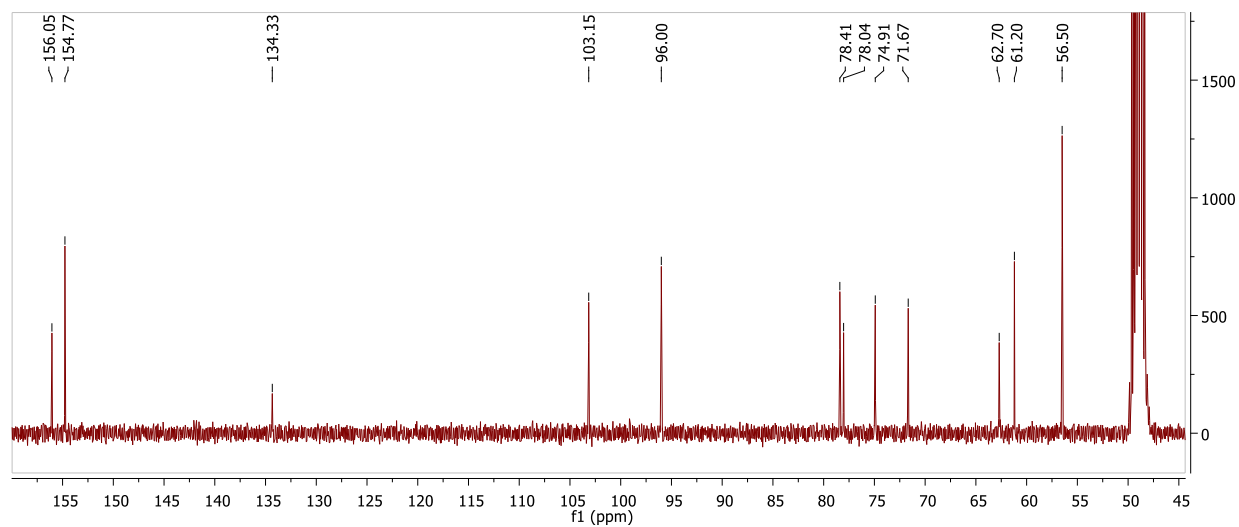
ANNEXE 13 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 21 (KOABURASIDE MONOMETHYL ETHER)

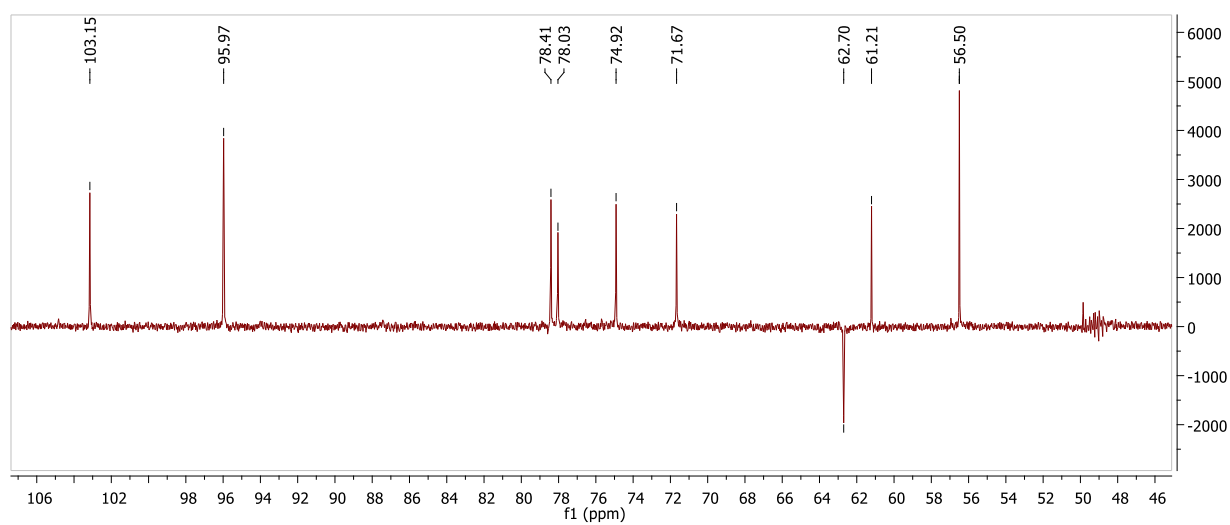
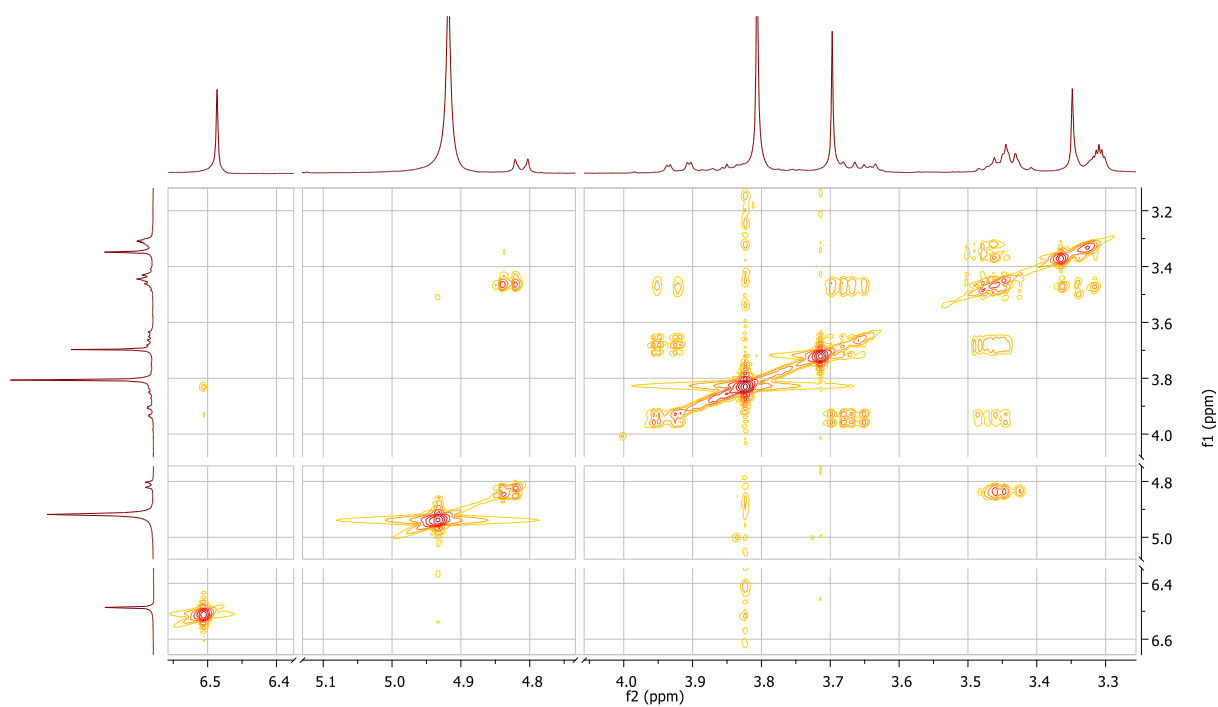


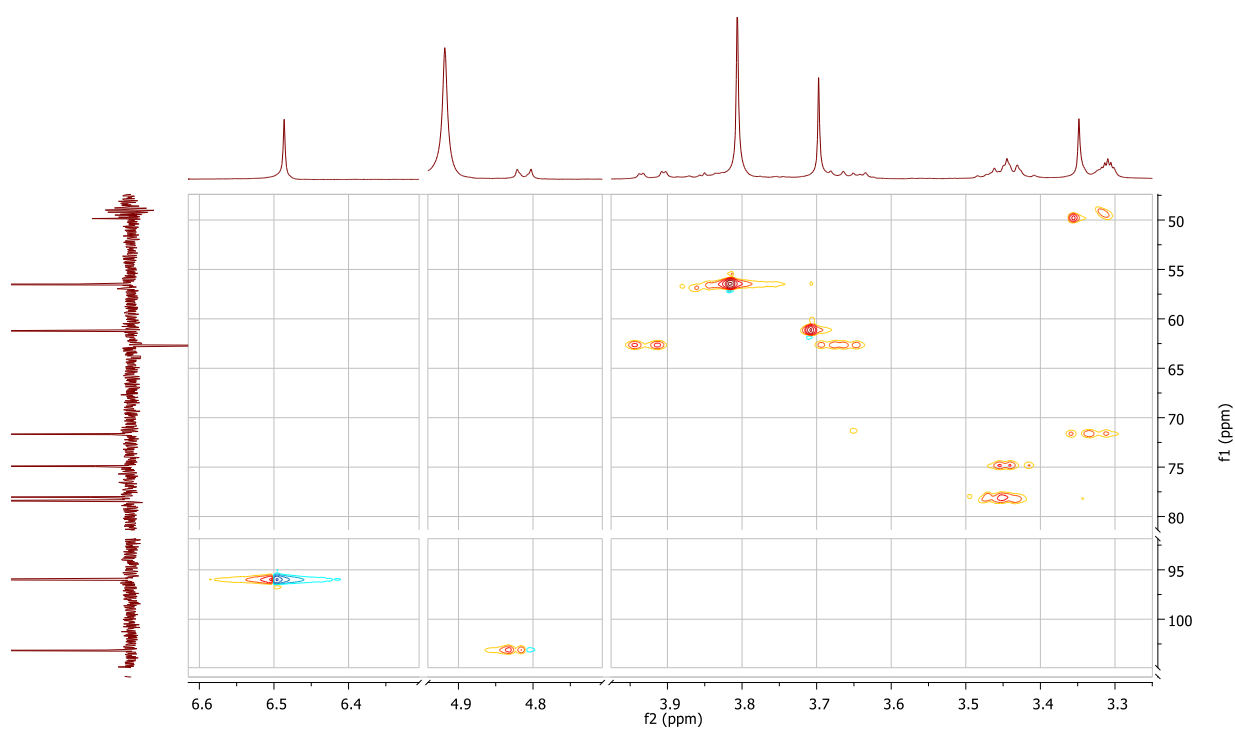
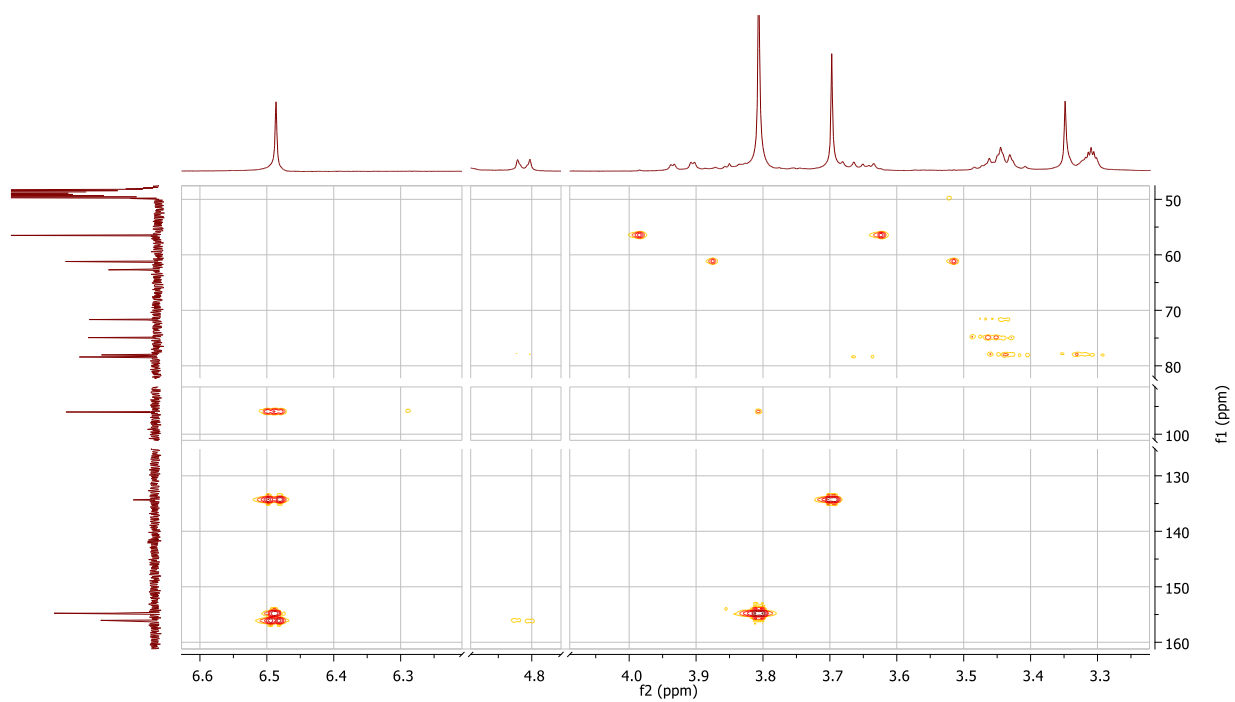
Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 21



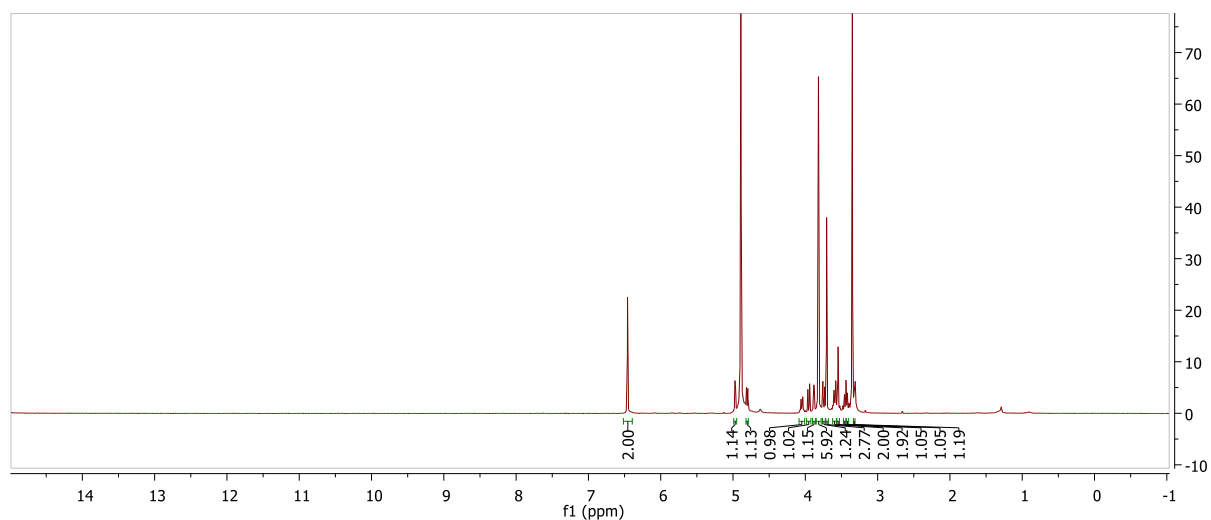
Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 21

Spectre RMN ^{13}C (CD₃OD, 100 MHz) de **21**Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD₃OD, 100 MHz) de **21**

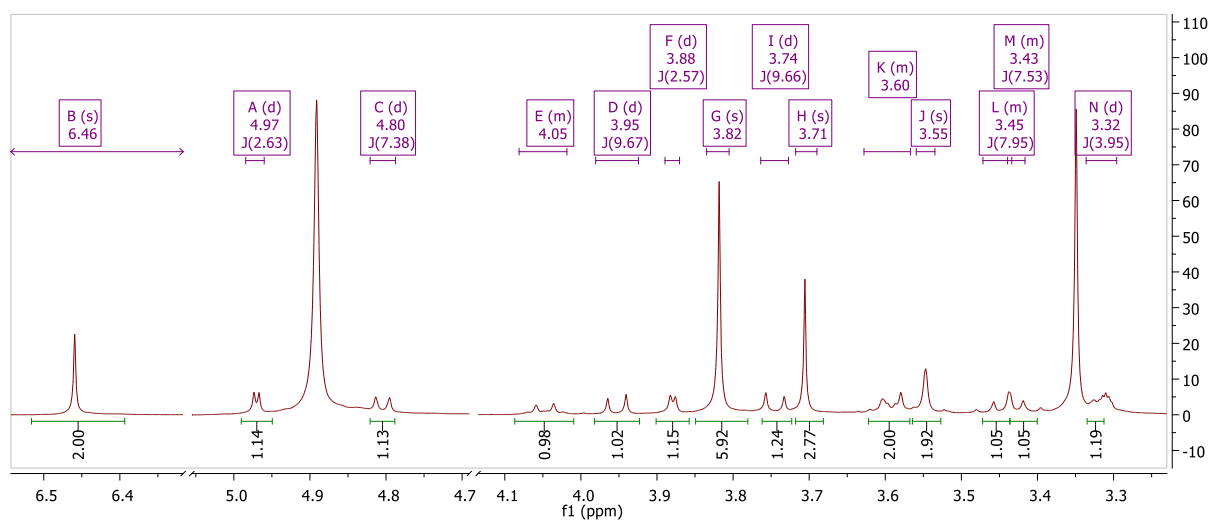
Agrandissement du spectre DEPT135 de **21**Agrandissement du spectre COSY de **21**

Agrandissement du spectre HSQC de **21**Agrandissement du spectre HMBC de **21**

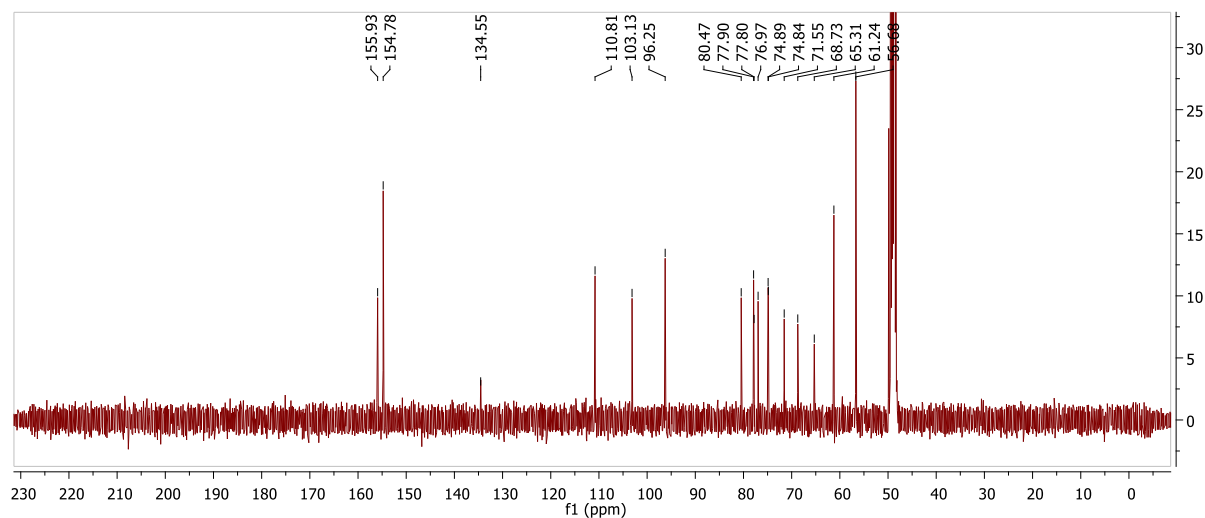
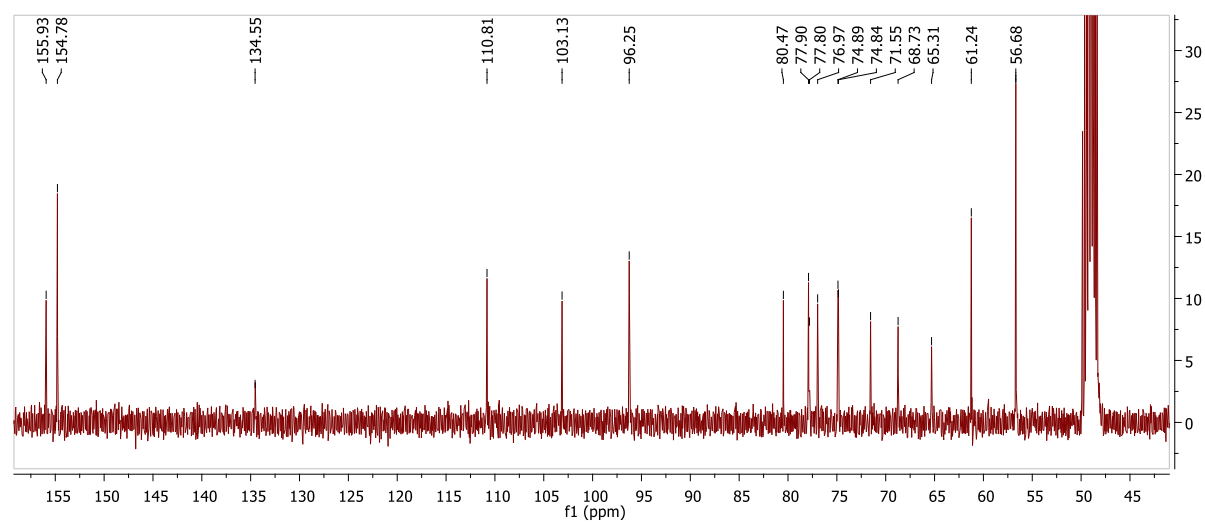
ANNEXE 14 : SPECTRES RMN DU COMPOSÉ 1 (KELAMPAYOSIDE A)



Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 1



Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de 1

Spectre RMN ^{13}C (CD₃OD, 100 MHz) de **1**Agrandissement du spectre RMN ^{13}C (CD₃OD, 100 MHz) de **1**