



Valorisation phytochimique et biologique des extractibles de bois de pin blanc

par

Christina Thibeault

B.Sc. Chimie

Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.) en ressources renouvelables

Québec, Canada

Juin 2023

RÉSUMÉ

Comme le montre le contexte sanitaire actuel, il existe encore un fort besoin de découverte de nouveaux médicaments pouvant agir sur un éventail de pathologies. Dans cette perspective, il faut admettre que les plantes demeurent une source privilégiée de composés bioactifs utiles. En effet, il est estimé que plus de 60 % des médicaments sont d'origine naturelle (produits naturels, dérivés de produits naturels, imitation synthétique de produits naturels, produits biologiques ou directement à base de plantes). La nature représente donc une source importante de composés bioactifs, et il existe toujours une grande proportion de plantes qui n'ont pas été étudiées et encore moins valorisées. À ce titre, la forêt boréale représente une banque potentielle de produits naturels pouvant faire l'objet de nouvelles voies de valorisation fine. Le pin blanc (*Pinus strobus*), qui est le plus grand conifère de l'est du Canada, démontre un intérêt en raison de l'activité antifongique qui le caractérise. À ce jour, peu d'études ont été réalisées sur ce dernier, bien qu'il soit utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle des Premières Nations pour le traitement de la douleur, des infections et de l'inflammation.

C'est dans cette optique que ce projet de recherche s'est penché sur l'activité biologique des extractibles de bois de pin blanc, l'identification des composés responsables des activités ciblées ainsi que la caractérisation structurale de ces derniers. Le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique a permis l'obtention de six fractions enrichies en composés polyphénoliques, dont deux fractions se démarquaient par leur activité antifongique, antioxydante et anti-inflammatoire. Les étapes de séparation subséquentes ont mené à l'identification de seize composés purs, soit le monométhyléther de pinosylvine, la pinocembrine, la 3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone, la cryptostrobine, la 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone, la tectochrysin, le monométhyléther de dihydropinosylvine, la chrysin, la 3-acétate pinobanksine, l'acide 7-oxo-dihydroabiétique, l'acide 12-hydroxyabiétique, l'acide 7-oxo-13-isopimarane-8,15-diène-18-oïque, le 1-monoglycéride d'acide pinolénique, le 1-monoglycéride d'acide linoléique, le diméthyléther de pinosylvine et la pinostrobine.

Parmi les composés isolés, ce sont le monométhyléther de pinosylvine ainsi que la pinocembrine qui présentaient les meilleures activités biologiques. Respectivement, les résultats antioxydants ORAC étaient de $18 \pm 1 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ et de $17,3 \pm 0,1 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$, tandis que l' IC_{90} mesurée contre *Candida albicans* (activité antifongique) étaient de $28 \pm 2 \mu\text{M}$ et de $38 \pm 4 \mu\text{M}$, pour une activité cytotoxique plutôt faible envers les cellules saines WS-1 avec des IC_{50} variant entre $192 \mu\text{M}$ et $200 \mu\text{M}$. De plus, une activité anti-inflammatoire a été observée pour le monométhyléther de pinosylvine, avec une IC_{50} de la production d'oxyde nitrique chez RAW 264.7 de $53 \pm 2 \mu\text{M}$.

Le dosage sur HPLC-DAD de ces deux composés d'intérêt au sein de l'extrait éthanolique de départ a donné des concentrations massiques sur masse sèche de $43,0 \pm 0,5 \text{ mg/g}$ pour le monométhyléther de pinosylvine et de $6,8 \pm 0,2 \text{ mg/g}$ pour la pinocembrine, suggérant que le monométhyléther de pinosylvine est le composé le plus prometteur pour le développement de produits à haute valeur ajoutée. Finalement, un essai de glycosylation a été réalisé pour améliorer l'hydrosolubilité de ce stilbène, et ainsi augmenter le nombre de voies de valorisation éventuelles. Le glucoside a été formé avec une seule étape de synthèse, sans groupements protecteurs, ce qui apporte une valeur ajoutée à ce projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1.....	4
ÉTATS DES CONNAISSANCES ET OBJECTIFS.....	4
1.1 Le pin blanc.....	4
1.1.1 Les Pinacées.....	4
1.1.2 Le genre <i>Pinus</i>	5
1.1.3 L'espèce <i>Pinus strobus</i>	6
1.2 Les métabolites secondaires.....	12
1.2.1 Les composés phénoliques.....	13
1.2.1.1 Les flavonoïdes.....	14
1.2.1.2 Les stilbénoloïdes.....	16
1.2.2 Les terpènes.....	18
1.2.2.1 Les acides résiniques.....	19
1.3 Objectifs 19	
1.3.1 Objectif principal.....	20
1.3.2 Objectifs spécifiques.....	20
CHAPITRE 2.....	21
RÉSULTATS ET DISCUSSION	21
2.1 Fractionnement bioguidé.....	21
2.1.1 Optimisation de la méthode d'extraction.....	21
2.1.2 Fractionnement de l'extrait éthanolique.....	24
2.2 Identification et caractérisation des composés isolés.....	30

2.2.1	Identification des composés isolés du bois de pin blanc	30
2.2.2	Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés	38
2.2.3	Activités biologiques des composés	48
2.3	Dosage des composés d'intérêt sur HPLC	53
2.3.1	Courbes d'étalonnage	55
2.3.2	Teneur des composés dans l'extrait brut	57
3.3	Travaux préliminaires de synthèse	58
3.3.1	Glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1	58
3.3.2	Activité biologique du glycoside 17	61
CHAPITRE 3		63
MATÉRIEL ET MÉTHODES		63
3.1	Matériel général et instrumentation	63
3.1.1	Matériel général	63
3.1.2	Instrumentation	64
3.2	Travaux d'extraction et de fractionnement	66
3.2.1	Extraction	66
3.2.2	Fractionnement et isolation de composés purs	66
3.3	Autres méthodes	71
3.3.1	Activités biologiques <i>in vitro</i>	71
3.3.2	Quantification sur HPLC-DAD	75
3.3.3	Glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1	76
CONCLUSION		77
BIBLIOGRAPHIE		79
ANNEXES – SPECTRES RMN		86
Annexe 1 : Spectres RMN de la 3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone 3		86
Annexe 2 : Spectres RMN de la 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone 5		88
Annexe 3 : Spectres RMN du 1-monoglycéride d'acide pinolénique 13		90
Annexe 4 : Spectres RMN du (-)-5-O-β-D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17		96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Utilisations des différentes parties du pin blanc par les Premières Nations.....	11
Tableau 2 : Effet des paramètres d'extraction sur le rendement de l'extrait éthanolique	23
Tableau 3 : Rendement d'extraction du bois de pin blanc dans les conditions optimisées	23
Tableau 4 : Activité antioxydante et dosage des phénoliques des fractions A à G	26
Tableau 5 : Activité antifongique sur <i>Candida albicans</i> des fractions A à G	26
Tableau 6 : Activité anti-inflammatoire sur RAW 264.7 des fractions A à G	26
Tableau 7 : Activité cytotoxique des fractions A à G	27
Tableau 8 : Activité antioxydante des composés purs majoritaires	50
Tableau 9 : Activité antifongique sur <i>Candida albicans</i> des composés purs majoritaires	51
Tableau 10 : Activité anti-inflammatoire sur RAW 264.7 des composés purs majoritaires	51
Tableau 11 : Activité cytotoxique des composés purs majoritaires	52
Tableau 12 : Résumé des activités biologiques du monométhyléther de pinosylvine 1 et de la pinoembrine 2, converties en µg/mL en comparaison avec leur fraction d'origine	53
Tableau 13 : Résultats du dosage du monométhyléther de pinosylvine 1 et de la pinoembrine 2 au sein de l'extrait éthanolique de bois de pin blanc et de la fraction enrichie D.....	57
Tableau 14 : Résumé des résultats d'activité biologique du 5-O-β-D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17	61

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples de voies de valorisation des résidus issus de l'industrie ligneuse	2
Figure 2 : Les espèces indigènes de Pinacées au Québec.....	5
Figure 3 : Distribution du pin blanc en Amérique du Nord	7
Figure 4 : Caractéristiques botaniques du pin blanc	8
Figure 5 : Voie biosynthétique générale des flavonoïdes et des stilbènes : Exemple de la pinocembrine et de la pinosylvine, des polyphénols retrouvés dans les extractibles de pin.	14
Figure 6 : Classification générale des flavonoïdes	15
Figure 7 : CCM de l'extrait hexanique (gauche) et de l'extrait éthanolique (droite) de bois de pin blanc (milieu d'éluion : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, UV 254 nm, sans révélateur).....	23
Figure 8 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait brut (extrait éthanolique) sur colonne de gel de silice : fractions A à G (milieu d'éluion : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, profil du haut : lumière visible, après H ₂ SO ₄ 20% dans le méthanol, profil du bas : lampe UV 254 nm, sans révélateur chimique).	25
Figure 9 : Schéma de fractionnement de la fraction D	28
Figure 10 : Schéma de fractionnement de la fraction E	29
Figure 11 : Comparaison des spectres UV fournis par le détecteur DAD de l'HPLC analytique : a. spectre du composé 1, b. spectre du composé 2, c. spectre du composé 15 et d. spectre du composé 16.	29
Figure 12 : Bilan du fractionnement du bois de pin blanc jusqu'aux composés isolés	30
Figure 13 : Structure des composés isolés de l'extrait éthanolique de bois de pin blanc	37
Figure 14 : Structure du monométhyléther de pinosylvine 1	38
Figure 15 : Structure de la (-)-pinocembrine 2	38
Figure 16 : Structure de la (+)-3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone 3	39
Figure 17 : Structure de la (-)-cryptostrobine 4	40
Figure 18 : Structure de la (+)-3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone 5	40
Figure 19 : Structure de la tectochrysin 6	41
Figure 20 : Structure du monométhyléther de dihydropinosylvine 7	42
Figure 21 : Structure de la chrysin 8	42
Figure 22 : Structure de la (+)-3-acétate-pinobanksine 9	43
Figure 23 : Structure de l'acide (+)-7-oxo-dihydroabiétique 10	43
Figure 24 : Structure de l'acide (+)-12-hydroxyabiétique 11	44
Figure 25 : Structure de l'acide (+)-7-oxo-13-isopimara-8,15-diène-18-oïque 12	45
Figure 26 : Structure du (+)-1-monoglycéride d'acide pinoléique 13	46
Figure 27 : Structure du (+)-1-monoglycéride d'acide linoléique 14	46
Figure 28 : Structure du diméthyléther de pinosylvine 15	47
Figure 29 : Structure de la (-)-pinostrobine 16	48
Figure 30 : Comparaison des structures chimiques de la pinocembrine 2 et de la quercétine (témoin positif au test antioxydant)	50
Figure 31 : Chromatogrammes HPLC-DAD 280 nm de l'extrait éthanolique (10 mg/mL), de la fraction D (5 mg/mL), du monométhyléther de pinosylvine 1 (1000 ppm) et de la pinocembrine 2 (1000 ppm) (voir les conditions dans la section <i>Matériel et méthodes</i>)	54
Figure 32 : Courbe d'étalonnage de l'aire sous la courbe selon la concentration en monométhyléther de pinosylvine 1 dans l'échantillon injecté	56

Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'aire sous la courbe selon la concentration en pinocembrine 2 dans l'échantillon injecté	56
Figure 34 : Schéma réactionnel de la glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1 et mécanisme du possible état de transition.....	59
Figure 35 : Structure du (-)-5- <i>O</i> -β-D-glucoopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17	60
Figure 36 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait éthanolique sur colonne de gel de silice : a. séparation avec dichlorométhane/méthanol, b. séparation avec hexanes/acétate d'éthyle (milieu d'élution des plaques : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm.....	67
Figure 37 : Résumé sur CCM du fractionnement de la fraction D (gauche) sur colonne de gel de silice et de celui de la fraction D2 (droite) sur HPLC semi-préparative (milieu d'élution des plaques : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm.....	68
Figure 38 : Résumé sur CCM du fractionnement de la fraction E (gauche) sur colonne de gel de silice et de celui de la fraction E2 (droite) sur HPLC semi-préparative (milieu d'élution des plaques : chloroforme/méthanol 15 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm (sauf pour 13 et 14, superposition des taches après révélation au H ₂ SO ₄ 20% dans méthanol)	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACN = Acétonitrile.
ACS = American Chemical Society.
CCM = Chromatographie sur Couche Mince.
CHNS = Carbone, hydrogène, azote, soufre.
COSY = Correlation spectroscopy.
DAD = Diode array detector.
DEPT135 = Distortionless enhancement by polarisation transfer.
DMSO = Dimethyl sulfoxide.
HBSS = Hank's balanced salt solution.
HMBC = Heteronuclear multiple-bond correlation.
HPLC = High pressure liquid chromatography.
HSQC = Heteronuclear single quantum coherence.
IC₅₀ = Concentration inhibitrice médiane.
IC₉₀ = Concentration inhibitrice à 90%.
J = Constante de couplage.
LCMS = Liquid chromatography mass spectrometry.
L-NAME = *N*-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride.
LASEVE = Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales.
LogP = Coefficient de partage octanol/eau.
MeOH = Méthanol.
MS = Mass spectrometry.
NA = Non applicable.
NO = Nitric oxide.
ORAC = Oxygen radical absorbance capacity.
PBS = Phosphate buffer-saline.
pH = Potentiel hydrogène.
Q-TOF = Quadrupole time of flight.
R_f = Rapport frontal.
RMN = Résonance magnétique nucléaire.
TE = Trolox.
Tma = Tonnes métriques anhydres.
UV = Ultra-Violet.

REMERCIEMENTS

La fin de cette maîtrise vient un sentiment d'accomplissement, mais aussi avec une certaine nostalgie en pensant aux bons moments et aux merveilleuses personnes qui ont grandement contribué à cette aventure. Je tiens donc avant tout à remercier mon directeur de recherche André Pichette ainsi que mes codirecteurs Jean Legault et Vakhtang Mshvildadze pour m'avoir offert un milieu d'apprentissage aussi stimulant, auquel j'ai pu évoluer avec confiance et autonomie. Je me compte chanceuse d'avoir eu accès à autant de ressources qui ont rendu cette expérience des plus enrichissantes.

Il est aussi important de souligner l'implication des autres professeurs du département. Je remercie particulièrement Serge Lavoie pour sa disponibilité et sa précieuse aide en RMN, ainsi que Jérôme Alsarraf pour son appui en synthèse. Il est inspirant de côtoyer des gens si passionnés, doués et généreux.

Mon expérience n'aurait pas été la même sans la présence de Balla Sylla. Merci pour ton travail acharné, tes conseils, ton ouverture et nos nombreuses discussions.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire de Jean Legault pour la réalisation des tests d'activités biologiques : Karl Lalancette, Catherine Dussault et Audrey Bélanger. En plus des précieux résultats qu'ils nous procurent, leur porte est toujours ouverte pour répondre à nos multiples questions.

J'ai eu la chance de faire un stage captivant en entreprise aux côtés de François Simard, qui, depuis le début de mon baccalauréat, m'a appris énormément. Par la même occasion, je souhaite remercier toute l'équipe de la division Biocarbone d'Elkem métal Canada Inc. ainsi que Marianne Piochon et Josianne Savard (CTVB) pour leur appui.

Je garde en tête de merveilleux souvenirs de mon passage au laboratoire LASEVE entre autres par mes amitiés qui se sont tissées avec mes collègues. Merci à Antoine Desportes, Marie Frissard, Naziha Bendou, Sandrine Guay, Soazic Lehervet et Sujit Manmode pour tous les bons moments partagés avec vous.

Un petit passage spécial pour ma collègue, et surtout amie, Joanne Plourde. Tu as été ma découverte et ma confidente dans toute cette aventure, et je souhaite à tout le monde qui entament les études supérieures d'avoir une personne comme toi à ses côtés.

Évidemment, l'inconditionnel soutien de ma famille depuis le début de mes études fut des plus précieux. Je souligne particulièrement celui de mon conjoint William Thériault qui m'a motivé à foncer vers ce programme et qui m'a permis d'y persévérer.

Enfin, je tiens à remercier le CRSNG, le FRQNT, le programme MITACS, la fondation de l'UQAC, la fondation Desjardins, la fondation Jacques Gagnon, la fondation Jean-Pierre Martin, la fondation Place du Royaume ainsi que la fondation Thomas-Léon Tremblay qui, par leur appui financier, m'ont permis de me consacrer pleinement à mes activités de recherche.

INTRODUCTION

Le territoire québécois est riche en ressources naturelles, en passant de l'eau potable à l'énergie hydroélectrique produite, mais également par l'importance des forêts et des biens et services qui en découlent. En effet, l'industrie forestière représente approximativement 1,6 % du produit intérieur brut de la province et plus de 8% des emplois¹. Ceci n'est pas surprenant considérant le fait que la superficie des forêts québécoises couvre au-delà de 905 000 km², soit plus de la moitié du territoire, représentant même 2% des forêts mondiales¹. Cependant, la production et les étapes de transformation associées à cette industrie génèrent de grandes quantités de résidus, ce qui implique qu'il faut accentuer nos efforts sur la gestion de cette ressource naturelle afin de poursuivre cette exploitation de façon durable.

Plus précisément, sans compter les résidus de coupe, c'était 7,5 millions de tonnes métriques anhydres (tma) de résidus qui ont été produits par cette industrie en 2022, soit 57% de copeaux, 20% de sciures et de rabotures et 23% d'écorces². Ces résidus proviennent majoritairement des premières étapes de transformation du bois, et sont majoritairement consommés pour la production d'énergie thermique. Cependant, une partie minoritaire est enfouie et demeure inexploitée, ce qui pourrait assurer un approvisionnement suffisant pour la transformation des composés issus du bois en produits à haute valeur ajoutée.

En plus de représenter une source économique novatrice pour l'industrie, tirer parti de ces bioressources leur permettrait de réduire leur empreinte environnementale et ainsi de se conformer davantage aux objectifs du développement durable, notamment en ayant un impact positif direct sur l'innovation de l'industrie, la consommation responsable et la lutte contre les changements climatiques. En tant que population, ce développement de nouveaux produits permettrait de diminuer notre dépendance aux dérivés du pétrole.

Plusieurs voies de valorisation peuvent découler de l'utilisation de la matière lignocellulosique, mais également des extractibles du bois (Figure 1). Ces composés que l'on peut facilement extraire de la matrice végétale avec différents solvants sont surtout des métabolites secondaires qui sont synthétisés par la plante pour des fonctions non essentielles

(ou non comprises aujourd'hui) à son développement, comme la défense contre les pathogènes par exemple, ce qui peut expliquer la fonction biologique de certains d'entre eux. La composition de ces derniers et la quantité disponible est énormément variable d'une essence à l'autre, d'où l'importance de bien documenter chaque espèce de façon individuelle.

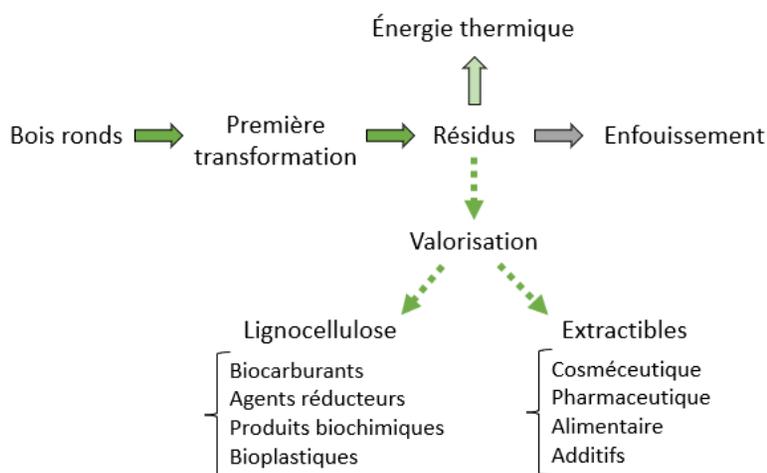


Figure 1 : Exemples de voies de valorisation des résidus issus de l'industrie ligneuse

Il est connu que certaines espèces de pin forment des extraits riches en composés actifs d'intérêt qui montrent parfois un certain potentiel pour une multitude d'applications dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques³. Un bon exemple est le Pycnogenol®, un extrait d'écorces de pin maritime (*Pinus pinaster*) qui exerce une série d'effets bénéfiques sur la peau, sur les fonctions pulmonaires et même sur les symptômes reliés à l'asthme^{4, 5}. La présence de nombreux polyphénols antioxydants explique en partie les activités observées.

C'est dans cette optique que ces travaux de recherche se sont penchés sur l'étude des extractibles d'une autre espèce de pin, *Pinus strobus*, dans le but d'évaluer le potentiel biologique d'une essence de la forêt boréale et d'ainsi collaborer au processus d'optimisation de la valorisation de nos résidus forestiers. Étant peu étudié au niveau de sa composition chimique et de son activité biologique, le pin blanc a été choisi pour cette étude. Les résultats obtenus lors de cette maîtrise seront donc complémentaires aux connaissances déjà acquises au laboratoire LASEVE sur le potentiel de divers extraits de la forêt boréale, ce qui contribuera

à élargir cette banque de données. Les méthodes analytiques de dosage développées ainsi que les données expérimentales des composés purs isolés pourront servir à d'autres projets dans le futur.

Ce mémoire comporte trois chapitres. Le premier chapitre décrit l'espèce végétale choisie ainsi que les familles chimiques des composés isolés lors de ces travaux, sous forme de revue de la littérature scientifique. Le deuxième chapitre présente les résultats obtenus pour l'ensemble des manipulations réalisées ainsi qu'une discussion qui met en évidence les points importants qui en ressortent. Le troisième chapitre détaille les procédures expérimentales mises en œuvre. Finalement, une conclusion suivie de perspectives futures sont mises en lumière à la fin de ce document.

CHAPITRE 1

ÉTATS DES CONNAISSANCES ET OBJECTIFS

1.1 Le pin blanc

1.1.1 Les Pinacées

Les Pinacées (*Pinaceae*) représentent la plus grande famille des conifères, comprenant environ 230 espèces regroupées en 11 genres. Ce sont des arbres ou des arbustes largement répartis dans l'Hémisphère Nord, représentant ainsi la composante la plus importante de la forêt boréale⁶. Cette famille constitue donc un réel intérêt économique comme source de matières premières pour l'industrie du bois, en plus de couvrir plusieurs rôles écologiques. En effet, la présence de ces espèces dans nos forêts est nécessaire à l'écosystème de nombreux organismes, en plus de contribuer grandement à la prévention de l'érosion des sols et à la séquestration du carbone atmosphérique⁷.

Bien qu'on les retrouve majoritairement dans les régions tempérées, certaines espèces de Pinacées peuvent résister à un éventail de conditions environnementales, y compris les variations de températures et la présence de sols secs, acides ou pauvres en nutriments⁸. Ceci suggère donc une bonne capacité d'adaptation qui expliquerait la vaste aire de répartition de cette famille.

En excluant les espèces introduites, dix espèces de Pinacées sont retrouvées au Québec (Figure 2). Le bois de certaines d'entre elles est notamment utilisé dans divers secteurs de l'industrie forestière tels que les pâtes et papiers, la charpenterie et la menuiserie, contribuant ainsi à l'économie de la province.

Beaucoup d'études ont été réalisées sur l'épinette noire en raison de son importance économique au Québec. En effet, l'épinette noire à elle seule représente en moyenne 55% des résineux utilisés en industries au cours des dix dernières années². Néanmoins, il ne faut pas négliger l'intérêt porté envers les espèces de pin, notamment du point de vue du développement de produits à haute valeur ajoutée.

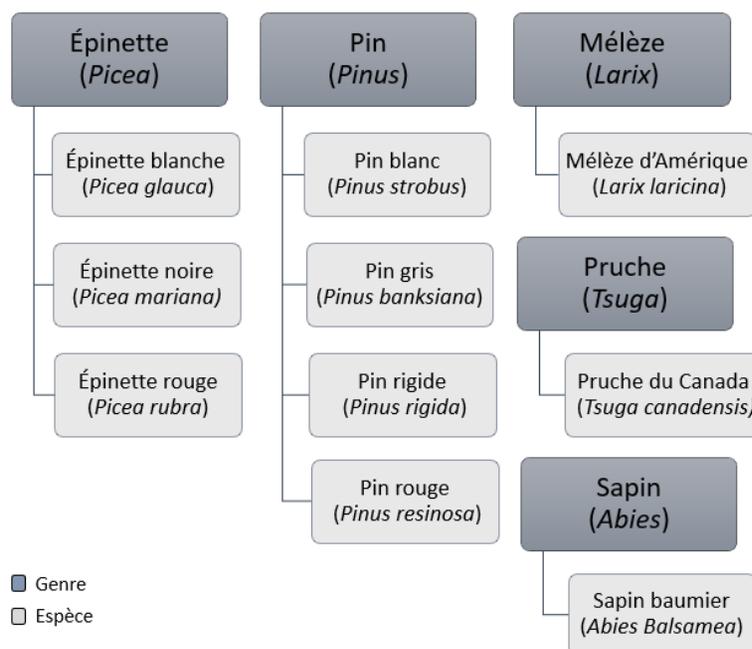


Figure 2 : Les espèces indigènes de Pinacées au Québec

1.1.2 Le genre *Pinus*

Les pins (*Pinus*) représentent le genre le plus important des Pinacées avec 115 espèces répertoriées, dont quatre sont indigènes au Québec. Ce sont des arbres ou des arbustes qui contiennent de la résine dans l'ensemble de leurs parties et qui ont des feuilles persistantes en forme d'aiguilles linéaires⁹. Les pins sont des plantes monoïques, c'est-à-dire qu'un même arbre porte les organes reproducteurs mâles et femelles. De façon générale, les nombreux cônes mâles sont situés à la base des nouveaux rameaux, alors que les cônes femelles, qui sont davantage solitaires ou en plus petits groupes, se retrouvent en position terminale (extrémité) de ces rameaux⁹. Ce positionnement favorise la fécondation entre des individus différents, optimisant ainsi la variation génétique. Tout comme les autres conifères, c'est au printemps que les cônes mâles s'ouvrent pour décharger une grande quantité de pollen dans l'air, dans le but d'atteindre les graines dans les cônes femelles. En revanche, chez les pins, il y a un délai d'un an entre l'étape de pollinisation et celle de la fécondation, ce qui allonge la durée de leur cycle de reproduction⁹.

Le bois de pin est majoritairement composé de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Il représente la plus grande valeur économique, notamment par la production de panneaux, de bois de menuiserie, de meubles et de combustibles³. De plus, plusieurs applications peuvent découler de l'utilisation des autres parties de l'arbre telles que les branches et les aiguilles en horticulture, la résine comme herbicide, l'essence de térébenthine contenue dans cette résine pour l'aromatisation d'aliments ou de parfums, les cônes comme insecticides, etc¹⁰.

Certaines de ces utilisations découlent de la présence d'extractibles, ces derniers représentant de 4 à 35% de la composition des pins selon la partie végétative³. Ces composés varient également selon l'espèce, l'âge, le moment de la récolte, l'origine génétique ainsi que la présence de certains stress (bactéries, champignons, environnement, herbivorie, etc.)¹¹. Ces extractibles pourraient expliquer les propriétés thérapeutiques de ces arbres. Traditionnellement, différentes parties de plusieurs espèces de pin sont utilisées à des fins médicinales, telles que le traitement de l'hépatotoxicité, des troubles gastriques, des infections et de l'inflammation¹²

1.1.3 L'espèce *Pinus strobus*

Le pin blanc est l'un des conifères les plus importants dans l'est de l'Amérique du Nord, que ce soit écologiquement, économiquement ou culturellement¹³. Communément appelé par les anglophones « Weymouth pine », « northern pine » ou encore « eastern pine », c'est le nom « biisaandago-zhingwaak » qui fut utilisé en premier par les Ojibwés, un peuple autochtone du Canada. Pour plusieurs peuples des Premières Nations de l'Amérique, le pin blanc est reconnu comme étant « l'Arbre de la paix ». C'est pour cette raison qu'il figure actuellement, et ce depuis 2017, au centre du drapeau de la Ville de Montréal, évoquant ainsi la présence de ces peuples sur l'île bien avant l'arrivée des Européens, et soulignant leur précieuse contribution à la fondation de la métropole. L'Ontario l'a également adopté comme symbole officiel en 1984 pour les mêmes raisons, en ajoutant aussi le fait que cet arbre fut une source importante de revenus lors de la création de la province.

Bien qu'il préfère les conditions tempérées, le pin blanc peut se développer dans des environnements variés comprenant une large gamme de températures et de types de sols, pouvant même être retrouvé jusqu'à 1220 mètres d'altitude¹³. En Amérique du Nord (Figure 3), il se trouve dans le sud du Canada, de Terre-Neuve à l'extrême sud-est du Manitoba, ainsi que dans 14 états des États-Unis, du Maine au sud-est du Minnesota, et vers le sud principalement dans les Appalaches jusqu'au nord de la Géorgie¹⁴.



Auteur : Halava, 24 août 2011. CC-BY-SA-3.0. Lien URL : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinus_strobus_range_map.svg

Figure 3 : Distribution du pin blanc en Amérique du Nord

Le pin blanc est un grand arbre de 30 à 35 m de longueur et de 100-180 cm de largeur pouvant atteindre des dimensions impressionnantes¹⁵. Comme les autres pins, ses aiguilles sont fasciculées et persistantes, mais ces dernières ont la particularité d'être regroupées en faisceau de 5 (Figure 4). Les aiguilles, qui mesurent de 8 à 13 cm, sont également grêles, vert pâle et luisantes¹⁶. Les cônes, eux, sont peu lignifiés et très allongés (10-15 cm), s'ouvrant à maturité en septembre avec des graines beaucoup plus courtes que leurs ailes^{15, 16}. L'écorce, qui est d'abord vert grisâtre, mince, lisse et composée d'écailles rectangulaires irrégulières, devient plus sombre et épaisse, voire gris-brun, à mesure que l'arbre vieillit.



Auteur : Ferdinand Bauer, 1 septembre 2008. CC-PD-Mark. Lien URL : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinus_strobus_\(Bauer\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinus_strobus_(Bauer).jpg)

Figure 4 : Caractéristiques botaniques du pin blanc

Bien qu'il puisse s'installer sur une grande variété de sols, passant des crêtes rocheuses aux tourbières, et dans 28 différents types de couverts forestiers¹³, la croissance du pin blanc est souvent favorisée sur les sols sablonneux et bien drainés¹⁷. Ce type de sol, dont la qualité varie de pauvre à moyenne, favorise ainsi sa compétition avec les autres espèces, tels que les feuillus. Dans des conditions optimales, ce dernier dispose d'une croissance rapide et parfois d'une longévité surprenante de 400 ans¹⁸. Certains sujets auraient même vécu plus de 600 ans¹⁸. Grâce à l'épaisseur de l'écorce et à la séparation importante entre le sol et les premières branches des individus plus âgés, ces derniers deviennent plus tolérants au brûlage, ce qui implique que la présence de perturbations naturelles comme les feux de forêt peuvent faciliter

une nouvelle génération de pin blanc¹⁹. En effet, ces phénomènes permettent entre autres l'ouverture du couvert, la préparation d'un meilleur lit de germination et l'élimination temporaire de la compétition, ce qui explique pourquoi cette espèce peut persister pendant des siècles sur des sites secs possédant des cycles de feu de 20 à 40 ans²⁰.

Le pin blanc compte parmi les arbres les plus grands, droits et larges de la forêt boréale, avec un bois relativement léger¹³. La qualité de son bois et la facilité de le travailler en font une espèce de choix pour divers usages dont la charpenterie, la menuiserie et l'ébénisterie, mais également la construction de navires qui lui a coûté une exploitation intensive au Canada durant tout le 19^e siècle²¹. En effet, son utilisation pour la production de mâts lors de la colonisation est l'une des principales causes de la diminution drastique de l'abondance et de la qualité de l'espèce. L'arrivée de nouvelles maladies, l'augmentation de la pollution et la mise en place de mesures de protection contre les feux de forêts ont aussi joué un rôle dans cette problématique.

De nos jours, le gouvernement du Québec et de l'Ontario, en collaboration avec des groupes de recherche universitaires, ont émis un plan d'intervention pour favoriser l'aménagement des grands pins au Québec (pin blanc et pin rouge), la qualité de leur bois et le maintien à long terme de leur population²². Certes, le pin blanc est l'essence résineuse dont le prix de vente compte parmi les plus élevés au Québec, notamment en raison de son potentiel pour le bois d'œuvre et pour le bois d'apparence²². Par ailleurs, c'est une espèce qui est favorisée pour une culture intensive, soit par la plantation et la régénération naturelle, puisqu'elle possède « une longue durée de vie, une bonne facilité à s'établir, une capacité à former des peuplements denses répondant positivement à divers types de gestions ainsi que peu de problèmes de ravageurs ou de maladies, en plus de dépasser presque toutes les autres espèces indigènes sur des sites de mauvaise qualité et d'être économiquement viables »²³. Ces raisons, en ajoutant sa croissance élevée et sa persistance dans plusieurs types d'environnements, en font également une espèce de choix pour la plantation en vue du contrôle de l'érosion¹³.

La richesse du pin blanc ne réside pas seulement dans l'utilisation industrielle de son bois. Autrefois, il représentait un élément clé de la vie traditionnelle en raison des nombreux biens et services qu'il pouvait fournir, notamment en tant qu'habitat pour les espèces fauniques d'intérêt et comme composant important des paysages, légendes et cultures, mais également comme plante médicinale²⁴. En effet, ce dernier est utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle des Premières Nations pour le traitement de la douleur, des infections et de l'inflammation²⁵. La grande majorité des parties de l'arbre étaient donc connues pour leurs propriétés et étaient utilisées à différentes fins (Tableau 1). L'écorce externe était surtout utilisée comme expectorant pour traiter les difficultés respiratoires, alors que d'autres parties telles que la sève et le bois étaient plutôt choisies pour soigner les plaies et les infections²⁶. Ceci suggérait déjà que différents composés étaient à l'origine des propriétés du pin blanc, et que la présence de ces derniers pouvait varier selon la partie en question.

Tout comme il était mentionné pour le genre *Pinus*, les activités biologiques du pin blanc peuvent entre autres être expliquées par les extractibles qui s'y trouvent. Ces extractibles, qui sont des composés de faibles poids moléculaires et qui, par le fait même, peuvent être facilement extraits des différentes parties de l'arbre, sont pour la plupart des métabolites secondaires. La dernière partie de cette revue de littérature se consacrera donc à la définition même d'un métabolite secondaire, ses principaux rôles au sein de l'arbre ainsi que les fonctions qui peuvent même devenir utiles pour l'humain, et ce, même après la mort végétale. Une revue des principales familles de métabolites secondaires présentent chez les pins permettra de mieux comprendre le type de molécules qui pourraient expliquer les propriétés du pin blanc et qui pourraient être valorisées.

Tableau 1 : Utilisations des différentes parties du pin blanc par les Premières Nations.

Partie de l'arbre	Forme	Utilisation	Nation
Écorce externe	Décoction	Toux	Abénaquis ²⁶
		Éruptions cutanées	Iroquois ²⁶
		Difficultés respiratoires	Iroquois ²⁷
	Brute	Crampes	Iroquois ²⁷
		Nettoyage de l'estomac	Iroquois ²⁶
		Prévention de la typhoïde	Iroquois ²⁶
	Infusion	Palpitations	Menominee ²⁶
Toux		Shinnecock ²⁶	
Écorce interne	Cataplasme	Rhume	Algonquins ²⁶ Attikameks ²⁶
		Plaies	Menominee ²⁶ Micmac ²⁶ Ojibwés ¹⁶
	Décoction	Plaies	Micmac ¹⁶ Montagnais ¹⁶
		Rhumatismes	Iroquois ²⁶
	Infusion	Rhume	Mohegan ²⁶
		Désinfectant	Ojibwés ¹⁶
Bois	Cataplasme	Plaies	Ojibwés ²⁶
	Infusion	Tonique	Iroquois ²⁶ Attikameks ¹⁶
		Irritation	Iroquois ²⁶
	Poudre	Plaies	Iroquois ²⁶
Branches	Infusion	Troubles rénaux	Delaware ²⁶ Micmac ¹⁶
		Maladies pulmonaires	Delaware ²⁶
	Décoction	Écrouelles	Iroquois ²⁶
		Furoncle	Iroquois ²⁶
Nœuds	Décoction	Stimulation de l'appétit	Delaware ²⁶ Iroquois ²⁷
Sève	Cataplasme	Panaris	Ojibwés ²⁶
		Furoncle	Delaware ²⁶ Mohegan ²⁶
		Hémorroïdes	Micmac ¹⁶
		Analgésique	Mohegan ²⁶
		Abcès	Mohegan ²⁶
		Coccyx cassé	Iroquois ²⁷
	Décoction	Maux de gorge	Montagnais ¹⁶
		Tuberculose	Montagnais ²⁶
Aiguilles	Décoction	Maux de tête	Ojibwés ²⁶
		Maux de dos	Ojibwés ²⁶
	Cataplasme	Maux de tête	Ojibwés ²⁶

1.2 Les métabolites secondaires

À l'inverse des métabolites primaires, comme les glucides, les protéines, les acides aminés ou encore les acides nucléiques, qui ont des rôles dans la croissance, le développement, la reproduction, la respiration ou la photosynthèse, les métabolites secondaires ont des fonctions plus diversifiées et souvent méconnues. En effet, les métabolites primaires sont plus simplement indispensables à la survie, alors que l'absence des métabolites secondaires n'impliquent pas une mort imminente, mais davantage un affaiblissement de la capacité d'une espèce à subsister dans son écosystème²⁸. Les métabolites primaires sont les précurseurs biosynthétiques des métabolites secondaires. Les fonctions des métabolites secondaires peuvent intervenir dans la protection contre les agents nuisibles, le transport de métaux, les hormones sexuelles, les effecteurs de différenciation, et parfois même dans la participation de la symbiose ou de la communication chimique avec d'autres organismes²⁹.

L'activité biologique attribuée à certains végétaux est souvent due aux métabolites secondaires responsables des défenses de la plante. Ces derniers peuvent protéger les plantes des attaques nuisibles des herbivores, insectes, champignons, bactéries ou autres pathogènes, et ils peuvent même jouer un rôle de protection ou de réparation contre le rayonnement du soleil¹¹. En plus de ces différentes interactions avec l'environnement, ces métabolites expliquent parfois aussi d'autres caractéristiques de la plante qui entrent dans les critères de sélection de l'homme. Il est possible de prendre en exemple la pigmentation, le goût et certaines propriétés des fruits et légumes, comme la fermentation ou le brunissement du bois³⁰.

Ce groupe comprend donc une grande diversité de produits naturels qui sont classés en fonction de leur origine biosynthétique. Par exemple, la voie des phénylpropanoïdes est une voie métabolique qui mène à la formation des composés phénoliques, comme la lignine, les flavonoïdes et les stilbènes qui sont généralement des métabolites secondaires très abondants dans le bois de pin³¹. Les terpénoïdes, dont les acides résiniques qui sont aussi présents en grande quantité dans le bois, mais surtout dans la résine des pins, sont quant à eux synthétisés par la condensation de deux ou de plusieurs unités isopréniques²⁸.

Dans tous les cas, la répartition de ces métabolites secondaires est très inégale d'une famille végétale à l'autre, mais aussi dans les différentes espèces du même genre, et même au sein d'une même espèce. Plusieurs variables telles que le type d'écosystème, la localisation géographique et les conditions climatiques peuvent impliquer une certaine réponse de l'arbre comme l'adaptation génétique ou encore la plasticité phénotypique, ce qui vient changer le profil métabolique sur le long terme, en plus des variations déjà existantes à court terme en lien avec les stress temporaires³².

1.2.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques représentent une famille chimique très importante dans les mécanismes de défense des arbres. À ce jour, plusieurs milliers de composés appartenant à cette famille ont été identifiés, et ce nombre ne cesse d'augmenter. Leur caractéristique commune est la présence d'au moins un noyau benzénique lié à un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Dépendamment du nombre de ces fonctions phénols, cette famille se divise en sous-catégories, soit les phénols simples comme les acides phénoliques, ou encore les polyphénols (diphénols, triphénols, etc.). La présence d'un noyau aromatique implique également que ces composés absorbent fortement la lumière UV, ce qui facilite la détection de ces composés. C'est notamment le cas pour les plaques CCM, où l'utilisation de révélateurs chimiques n'est pas indispensable. Le caractère aromatique de ces composés peut dans certains cas expliquer l'activité antioxydante observée, et ce, autant *in vitro* que *in vivo*³³.

Ces composés peuvent être présents chez les animaux, mais ils sont surtout caractéristiques des plantes, dans lesquelles ils sont beaucoup plus abondants et diversifiés. Tout comme c'était le cas pour les métabolites secondaires en général, leur répartition dans les végétaux est très inégale et dépend fortement de sa fonction biologique et de l'interaction entre la plante et son environnement. Les composés phénoliques sont localisés dans les vacuoles pour ceux qui sont davantage hydrophiles, dans la paroi pour la lignine et ceux qui

sont liés à des squelettes lipidiques, ou encore dans les tissus, et même parfois dans les exsudats, pour les composés plus apolaires³⁰.

Parmi les différentes classes de composés phénoliques, ce sont les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆) et les stilbénoides (C₆-C₂-C₆) qui seront présentés ici. La voie biosynthétique générale de ces derniers, à partir de la phénylalanine, est présentée à la Figure 5.

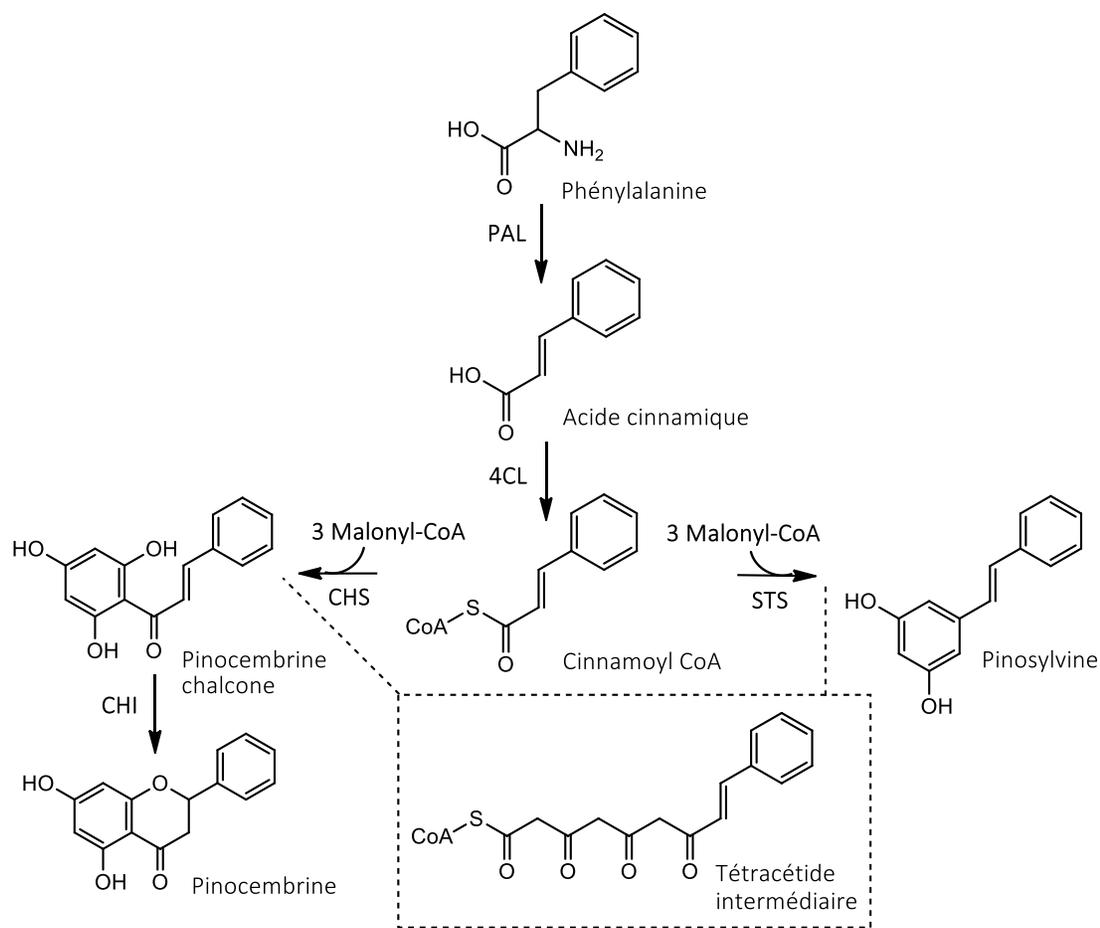


Figure 5 : Voie biosynthétique générale des flavonoïdes et des stilbènes : Exemple de la pinocembrine et de la pinosylvine, des polyphénols retrouvés dans les extractibles de pin. PAL, phénylalanine ammonia-lyase ; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase, STS, stilbène synthase, CHS, chalcone synthase. CHI, chalcone isomérase

1.2.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés omniprésents chez les plantes qui représentent le plus grand groupe de la famille des composés phénoliques³⁴. Ils possèdent une structure générale en C₁₅, à partir de laquelle il peut y avoir divers degrés d'hydroxylation, ce qui

explique les variations de couleurs des composés en question, et différents niveaux de méthylation, ce qui contribue à augmenter le caractère apolaire³⁰. Dans certains cas, ils peuvent être liés à des sucres par un lien glycosidique sur une de leurs fonctions hydroxyles (ou plusieurs), ce qui augmente nettement leur hydrosolubilité. C'est cependant la structure du cycle central ainsi que son degré d'oxydation qui permet de diviser les flavonoïdes en différentes classes (Figure 6).

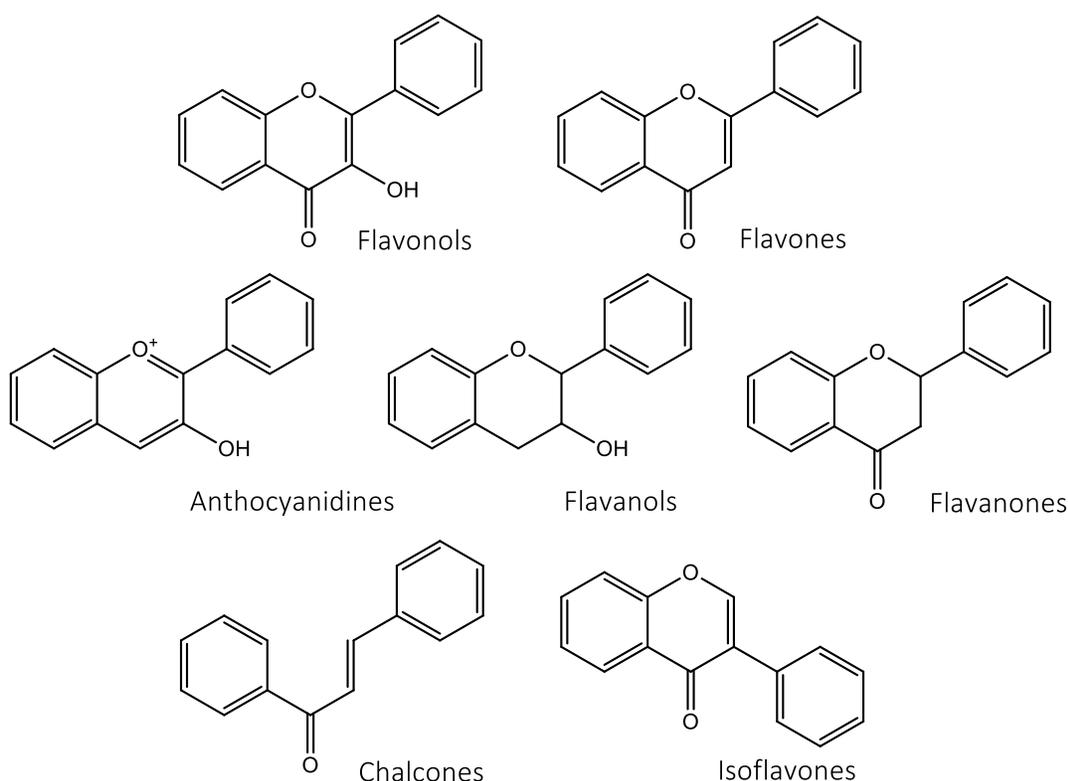


Figure 6 : Classification générale des flavonoïdes

Les flavonoïdes assurent plusieurs rôles au sein des plantes. Notamment, ils participent à leur protection contre les stress biotiques (herbivores, pathogènes) et abiotiques (rayonnement UV, chaleur), à des interactions avec les pollinisateurs ainsi qu'à des fonctions régulatrices et de signalisation³⁵. En effet, ils sont en partie responsables de la couleur, de l'odeur et du goût des fleurs, fruits et graines, ce qui rend les plantes plus attractives pour les insectes et animaux qui sont nécessaires à leur reproduction, et à l'inverse, ils peuvent repousser d'autres espèces nuisibles, en donnant un goût amer par exemple.

D'autres raisons expliquent pourquoi les flavonoïdes font partie des mécanismes de défense des plantes. Par exemple, la présence de doubles liaisons conjuguées et de groupements hydroxyles en font de très bons antioxydants qui peuvent réduire le potentiel redox ainsi que la présence de radicaux libres dans les cellules³⁵. Leur capacité à former des complexes avec des protéines, donc avec les parois cellulaires bactériennes, permet entre autre d'inhiber leurs récepteurs, expliquant ainsi leur pouvoir bactéricide¹¹. Mis à part l'activité antioxydante et antibactérienne, soit celles étant les plus décrites dans la littérature, certains flavonoïdes possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antifongiques et antivirales³⁶.

Plusieurs flavonoïdes ont été identifiés chez différentes espèces de pin, dont la pinobanksine, la pinocembrine, la taxifoline, la naringénine, la quercétine, la catéchine et le kaempférol, qui sont souvent les plus mentionnés^{11, 37-39}. La liste des composés identifiés chez les pins qui appartiennent à ce groupe est souvent plus longue, comprenant une grande diversité de composés dont la forme glycosylée est souvent également présente au sein des extraits.

1.2.1.2 Les stilbénoides

Les stilbénoides, quant à eux, sont des composés phénoliques caractérisés par la présence de deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison. Ce sont généralement de petites molécules (\approx 200-300 g/mol), sauf dans le cas des oligomères, ces derniers étant obtenus par la condensation oxydative entre deux ou plusieurs stilbènes monomériques. La présence de ces oligomères, qui peuvent autant être homogènes qu'hétérogènes, implique qu'il existe une grande diversité de structures et de configurations au sein de ce groupe⁴⁰. La structure des différents stilbénoides varie également selon les niveaux d'hydroxylation, de méthylation, d'acylation, d'isomérisation et de glycosylation, impliquant des changements au point de vue de la stabilité et de l'hydrosolubilité des composés en question¹¹.

Les stilbénoides sont des phytoalexines, soit des composés qui sont synthétisés par la plante en réponse à un stress biotique ou abiotique⁴¹. Leurs rôles sont donc surtout liés aux

mécanismes de résistance contre les attaques de pathogènes (insectes, champignons et bactéries) ou de rayons UV, ainsi que dans le processus de renforcement de la paroi cellulaire en réponse à une infection⁴¹. En effet, chez les arbres, certaines études montrent la corrélation positive entre la résistance du duramen à la pourriture et sa teneur en stilbènes⁴². Toutes ces caractéristiques coïncident bien avec la variété des activités biologiques qu'ils présentent. Entre-autres, des propriétés antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et antibactériennes sont souvent répertoriées pour ce genre de composés, et certaines études ont récemment démontré une activité prometteuse dans la prévention du cancer⁴³. Parmi les deux isomères possibles pour chaque stilbène, c'est souvent l'isomère trans (E), soit le plus abondant dans la nature, qui présente l'activité biologique la plus intéressante ainsi que la meilleure stabilité⁴³.

Ces composés phénoliques sont produits dans plusieurs familles de plantes, mais ils sont surtout connus pour leur abondance dans la famille des Vitaceae, dont le célèbre raisin de vigne (*Vitis vinifera*)¹². Parmi les stilbènes du raisin, on retrouve le resvératrol, qui est l'un des produits naturels les plus étudiés, notamment pour sa faible toxicité, ses effets biologiques variés et son potentiel commercial⁴⁴. En plus de son action antioxydante, de nombreuses études mentionnent son potentiel en tant qu'agent cardioprotecteur, anti-inflammatoire et anticancéreux^{43, 45}.

Chez les pins, les stilbènes qui ont été rapportés sont la pinosylvine et ses dérivés méthylés. En plus d'être présente en grande quantité, certaines études sur la pinosylvine montrent que ses activités antibactériennes et antifongiques sont même supérieures à celles du resvératrol sur les lignées cellulaires testées⁴⁶. Cette dernière agirait également comme un inhibiteur des métastases des cellules tumorales⁴⁷. Par ailleurs, dans le bois de pin, une grande partie de la pinosylvine est transformée en monométhyléther de pinosylvine par des enzymes en conditions de stress, ce qui suggère que ce dérivé est encore plus efficace vis-à-vis des infections¹¹.

Plusieurs raisons expliquent donc le grand potentiel d'application de ces composés dans les secteurs alimentaires et pharmaceutiques. Un des bons exemples est celui du tamoxifène, un dérivé de stilbène qui est actuellement utilisé dans le traitement de cancers du sein

hormonodépendants chez la femme⁴³. Les stilbènes de la famille de la pinosylvine peuvent également être de bons candidats pour la mise au point d'agents antifongiques et/ou nématicides⁴⁸. La pinosylvine et certains dérivés font l'objet de différents travaux, mais des études supplémentaires seront nécessaires avant une éventuelle commercialisation.

1.2.2 Les terpènes

Finalement, après les composés phénoliques, une autre famille de métabolites secondaires abondante chez les pins est la famille des terpènes. Ce sont des composés très diversifiés que l'on rencontre dans tous les organismes vivants. Les terpènes peuvent être des molécules variées avec des structures linéaires à polycycliques, de faible à relativement haut poids moléculaires. Ces composés sont tous constitués d'au moins une unité isoprène (C5) caractéristique. Les terpènes sont généralement biosynthétisés à partir de l'isopentényl-pyrophosphate et du diméthylallyl-pyrophosphate²⁸. Ils sont classés par le nombre d'unités à cinq carbones de leur structure centrale. Les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40)²⁸ sont des sous classes de terpène relativement bien connues. En raison de ces différences de taille, certains terpènes seront très volatiles, alors que d'autres ne le seront pas.

Cette diversité de structure implique également beaucoup de variations au niveau de leurs rôles au sein des plantes. De façon générale, ils entrent dans les mécanismes de protection de par leurs propriétés insecticides et antimicrobiennes, ils participent aux phénomènes allélopathiques des exsudats racinaires et ils aident à la communication avec l'environnement de la plante, en attirant indirectement les ennemis naturels des ravageurs des plantes par exemple⁴⁹. En plus de ces propriétés, ils possèdent une large gamme d'activités biologiques pouvant faire office d'usages thérapeutiques : antispasmodiques, antiviraux, anticancéreux et antidiabétiques⁵⁰. Ils sont cependant beaucoup plus utilisés dans l'industrie des arômes et des parfums.

Plusieurs classes de terpènes ont été rapportées chez le genre *Pinus*, notamment les monoterpènes tels que l' α -pinène, le β -pinène et le camphène, certains sesquiterpènes comme

le β -caryophyllène et le germacrène D, mais surtout, une grande quantité de diterpènes, ou plus précisément, d'acides résiniques⁵¹.

1.2.2.1 Les acides résiniques

Les acides résiniques sont des acides diterpéniques (C₂₀) non volatils qui sont abondants dans l'oléorésine des conifères, notamment chez les pins. Leur squelette de base général est composé de trois cycles fusionnés, dans lesquels se trouve des fonctions méthyles et des doubles liaisons sur l'une ou l'autre des positions, et d'une fonction acide carboxylique. Ces composés, qui sont produits dans les aiguilles, mais surtout dans les canaux résinifères des arbres, possèdent une grande stabilité chimique, d'où leur importance dans les recherches taxonomiques et génétiques des conifères⁵². Chez le genre *Pinus*, les principaux acides résiniques retrouvés sont de type abiétane, tels que l'acide abiétique, l'acide déhydroabiétique, l'acide néoabiétique, l'acide palustrique ou encore l'acide lévopimarique, et de type pimarane, comme l'acide pimarique et l'acide isopimarique⁵¹.

Il existe de nombreuses études démontrant la relation entre la teneur en acides résiniques et la résistance des arbres aux attaques d'herbivores, et c'est surtout l'activité antibactérienne qui est mise de l'avant dans les tests cellulaires⁵³. En plus du potentiel thérapeutique, ces composés ont une grande viscosité et très peu d'affinité pour l'eau. Ils sont donc utilisés dans différentes applications industrielles telles que les adhésifs polyvalents et les scellants³.

Les activités biologiques reconnues des différentes parties du pin blanc peuvent provenir des métabolites secondaires qu'il contient. La méthode de fractionnement mise au point dans ces travaux permettra de déterminer si ce sont les flavonoïdes, les stilbénoloïdes, les acides résiniques, ou encore un autre groupe, qui sont responsables de l'effet thérapeutique observé dans la médecine traditionnelle.

1.3 Objectifs

Dans la continuité de l'avancement des connaissances sur la composition des extractibles d'espèces de la forêt boréale, ce projet de maîtrise visait l'analyse phytochimique

et l'évaluation de l'activité biologique d'extraits de bois de pin blanc (*Pinus strobus*), une espèce peu étudiée du genre *Pinus*.

1.3.1 Objectif principal

Analyser les extractibles du bois de pin blanc pour évaluer le potentiel de valorisation des résidus provenant de l'industrie forestière.

1.3.2 Objectifs spécifiques

- Optimiser la méthode d'extraction pour obtenir un extrait enrichi en molécules d'intérêt, de façon simple et efficace ;
- Évaluer le potentiel d'activité biologique des extraits obtenus, en partie basé sur les utilisations traditionnelles du bois de pin blanc ;
- Isoler et identifier les composés responsables de l'activité biologique ;
- Caractériser la structure chimique de chaque composé isolé ;
- Quantifier les composés d'intérêt au sein de la matrice végétale de départ ;
- Évaluer le potentiel de valorisation selon les données obtenues ;

CHAPITRE 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Fractionnement bioguidé

2.1.1 Optimisation de la méthode d'extraction

Tout d'abord, la méthode d'extraction ainsi que certains paramètres, tels que la température, le temps, le choix du ou des solvants ainsi que le ratio solide/liquide, ont été optimisés de sorte à augmenter le potentiel d'utilisation à grande échelle tout en conservant un bon pourcentage de rendement. Puisque les métabolites secondaires tels que les composés phénoliques sont présents dans les vacuoles cellulaires végétales⁵⁴, la méthode d'extraction doit permettre la rupture de la paroi cellulaire afin d'en libérer les composés dans le solvant utilisé. De plus, une température d'extraction trop élevée peut favoriser la dégradation de certains composés et même, dans certains cas, diminuer la bioactivité de l'extrait⁵⁵.

En se basant sur ces connaissances, l'extraction des copeaux de bois de pin blanc (broyés et séchés) sera assistée par les ultrasons et effectuée de manière séquentielle à l'aide d'hexanes et d'éthanol 95%⁵⁶. Ce type d'extraction a été choisi en raison de son efficacité et de son potentiel d'utilisation à l'échelle industrielle. En effet, par rapport à l'extraction conventionnelle, l'extraction assistée par les ultrasons offre plusieurs avantages telles que la réduction du temps, l'augmentation du rendement et la diminution de la température⁵⁷. Le choix des solvants a été basé quant à lui sur des travaux d'optimisation de méthodes d'extraction des polyphénols de bois de pin⁵⁸. L'utilisation de ces deux solvants permettra de séparer grossièrement le contenu chimique de la matrice végétale en deux extraits de polarité distincte. Les composés très apolaires tels que les lipides se retrouveront dans l'extrait hexanique, tandis que les composés polaires comme les phénols seront plutôt extraits par l'éthanol.

Le Tableau 2 résume le pourcentage de rendement de l'extrait éthanolique selon les différents paramètres d'extraction utilisés. Pour le ratio solide/liquide entre la masse de matière végétale et le volume de solvant, les résultats indiquent que le rendement d'extraction n'augmente plus au-delà d'un ratio d'un (1) pour sept (7). Ensuite, pour la durée, le rendement atteint un plafond à partir de 40 minutes. À des fins de comparaison, ces mêmes conditions ont été testées avec une extraction à reflux. Même en augmentant le temps de reflux à 90 minutes, le rendement n'excède pas les 2,7 % obtenus par ultrasons. La méthode par reflux ne sera pas retenue étant donné que la température élevée peut endommager la qualité de l'extrait. De plus, les résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire de chauffer lorsque l'on utilise les ultrasons puisque le rendement n'augmente pas significativement avec la température d'extraction.

Les conditions finales, soit un ratio solide/liquide d'un (1) pour sept (7) pendant une durée de 40 minutes à la température de la pièce au bain à ultrasons, donnent un rendement de 3,1 % d'extrait hexanique et de 2,7 % d'extrait éthanolique (Tableau 3). Cinq extractions selon ces mêmes conditions ont permis de déterminer les écart-types qui sont respectivement de 0,1 % et de 0,2 %. Cependant, ces données peuvent varier selon la partie de la plante et les caractéristiques de l'individu utilisé (âge du bois, moment de la récolte, origine, présence ou absence de stress environnementaux, etc.). Néanmoins, ce sont des rendements assez typiques pour de telles biomasses, avec une teneur en extractibles nettement inférieure à ce qu'on peut s'attendre sur des écorces^{58, 59}.

La CCM des deux extraits (Figure 7) suggère que l'extrait éthanolique est qualitativement plus riche en composés aromatiques qui absorbent les rayonnements UV. Le dosage des composés phénoliques par la méthode au Folin-Ciocalteu confirme cette affirmation avec des résultats en pourcentage massique de $0,5 \pm 0,3$ % et de 6 ± 2 % respectivement pour l'extrait hexanique et l'extrait éthanolique. La suite du fractionnement se poursuivra donc avec l'extrait éthanolique.

Tableau 2 : Effet des paramètres d'extraction sur le rendement de l'extrait éthanolique

	Ratio solide/liquide	Durée (min)	Rendement de l'extrait éthanolique (% massique sur base sèche)
Ultrasons	1 pour 5	60	1.9
	1 pour 7	60	2.7
	1 pour 8	60	2.7
	1 pour 10	60	2.7
	1 pour 7	10	1.8
	1 pour 7	20	2.3
	1 pour 7	30	2.6
	1 pour 7	40	2.7
	1 pour 7	50	2.7
	1 pour 7	60	2.7
Reflux	1 pour 7	60	2.7
	1 pour 7	90	2.7

Tableau 3 : Rendement d'extraction du bois de pin blanc dans les conditions optimisées

Extrait	Rendement (%)	Écart-type (%)
Hexane	3.1	0.1
Éthanol	2.7	0.2

**Figure 7** : CCM de l'extrait hexanique (gauche) et de l'extrait éthanolique (droite) de bois de pin blanc (milieu d'élution : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, UV 254 nm, sans révélateur)

2.1.2 Fractionnement de l'extrait éthanolique

Un premier fractionnement par chromatographie éclair sur gel de silice a permis de séparer l'extrait éthanolique en sept fractions à l'aide d'un gradient d'éluant de polarité croissante (dichlorométhane/méthanol 100 :0, 70 :1, 40 :1, 20 :1, et 0 :100). Ces fractions, nommées A à G, ont été obtenues avec un rendement total massique de 92,4 %. La Figure 8 présente la CCM des fractions A à G révélée premièrement avec les UV à une longueur d'onde de 254 nm et ensuite avec la lumière visible suivant un traitement avec 20% d'acide sulfurique (H₂SO₄). Ces dernières ont été soumises à différents tests d'activité biologique *in vitro*, et parmi les résultats obtenus, ce sont les activités antioxydantes (Tableau 4), antifongiques (Tableau 5), anti-inflammatoires (Tableau 6) et cytotoxiques (Tableau 7) qui guideront la suite du fractionnement.

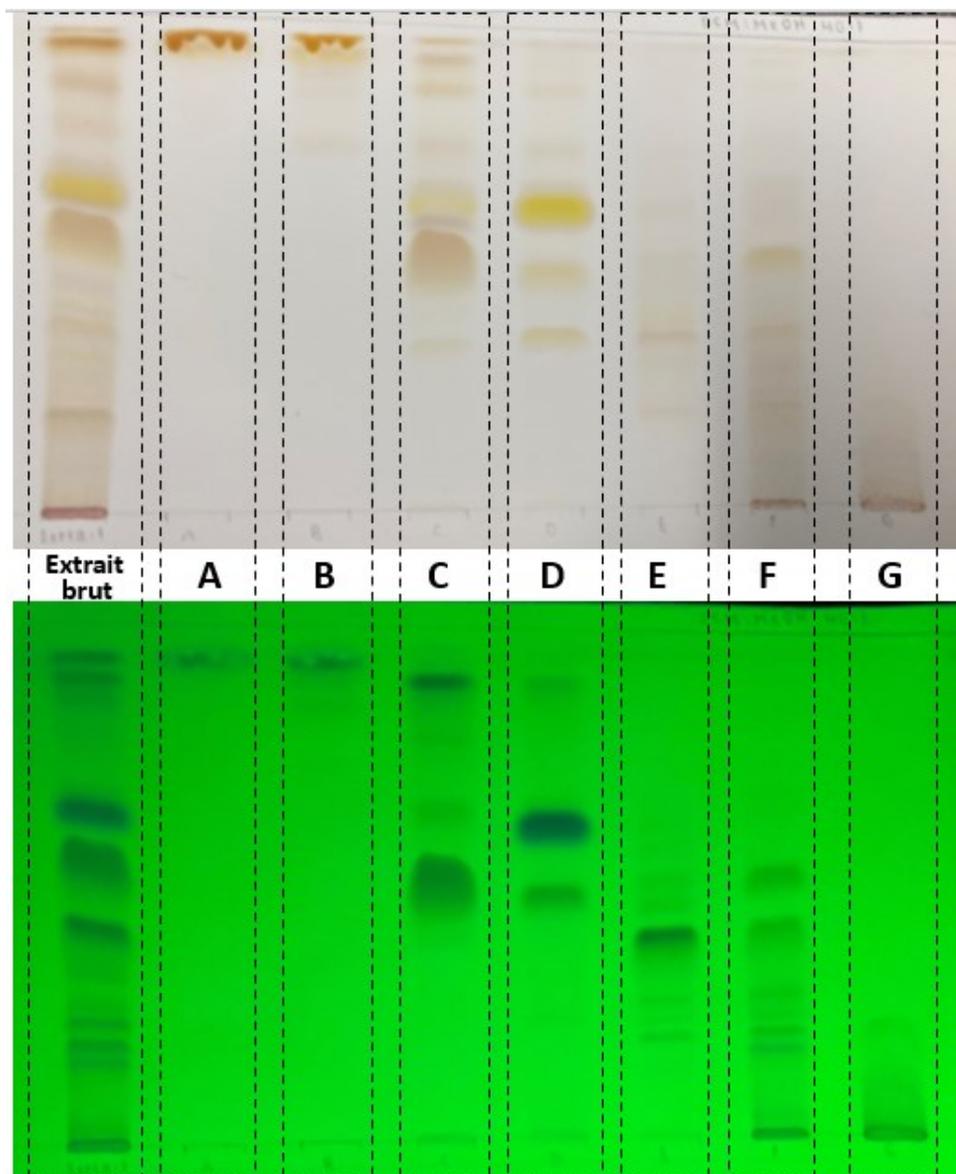


Figure 8 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait brut (extrait éthanolique) sur colonne de gel de silice : fractions A à G (milieu d'éluion : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, profil du haut : lumière visible, après H₂SO₄ 20% dans le méthanol, profil du bas : lampe UV 254 nm, sans révélateur chimique).

Tableau 4 : Activité antioxydante et dosage des phénoliques des fractions A à G

	ORAC ($\mu\text{mol TE/mg}$)	Antioxydant cellulaire sur WS-1 (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$)	Folin Ciocalteu (%m/m)
Extrait éthanolique	2,4 \pm 0,4	> 100	6 \pm 2
Fraction A	0,18 \pm 0,05	> 100	0,6 \pm 0,2
Fraction B	0,41 \pm 0,07	> 100	1,4 \pm 0,6
Fraction C	3,6 \pm 0,9	> 100	2,4 \pm 0,4
Fraction D	13 \pm 3	> 100	37 \pm 6
Fraction E	3,7 \pm 0,7	> 100	15 \pm 1
Fraction F	3,5 \pm 0,5	> 100	13 \pm 3
Fraction G	1,1 \pm 0,2	31 \pm 7	6 \pm 1
Quercétine	23 \pm 6	0,24 \pm 0,03	N/A

Tableau 5 : Activité antifongique sur *Candida albicans* des fractions A à G

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrait éthanolique	> 200	> 200
Fraction A	> 200	> 200
Fraction B	> 200	> 200
Fraction C	> 200	> 200
Fraction D	24,8 \pm 0,4	26,8 \pm 0,8
Fraction E	53,8 \pm 0,6	60,0 \pm 0,6
Fraction F	139,5 \pm 0,3	197 \pm 4
Fraction G	> 200	> 200
Amphotéricine B	0,62 \pm 0,06 μM	0,75 \pm 0,08 μM

Tableau 6 : Activité anti-inflammatoire sur RAW 264.7 des fractions A à G

	IC_{50} anti-inflammatoire ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibition NO à concentration maximale non toxique
Extrait éthanolique	> 160	42,0 % à 160 $\mu\text{g/mL}$
Fraction A	70 \pm 23	52,3 % à 80 $\mu\text{g/mL}$
Fraction B	> 160	40,6 % à 160 $\mu\text{g/mL}$
Fraction C	> 80	39,5 % à 80 $\mu\text{g/mL}$
Fraction D	41 \pm 5	65,8 % à 80 $\mu\text{g/mL}$
Fraction E	49 \pm 7	69,6 % à 80 $\mu\text{g/mL}$
Fraction F	51 \pm 6	59,1 % à 80 $\mu\text{g/mL}$
Fraction G	130 \pm 30	61,7 % à 160 $\mu\text{g/mL}$
L-name	1 mM	70,4 \pm 0,2

Tableau 7 : Activité cytotoxique des fractions A à G

	IC₅₀, A-549 (µg/mL)	IC₅₀, DLD-1 (µg/mL)	IC₅₀, WS-1 (µg/mL)
Fraction A	> 200	> 200	> 200
Fraction B	> 200	> 200	> 200
Fraction C	> 200	> 200	> 200
Fraction D	89 ± 4	67 ± 3	74 ± 6
Fraction E	160 ± 7	> 200	193 ± 6
Fraction F	> 200	> 200	> 200
Fraction G	> 200	> 200	> 200
Etoposide	3,7 ± 0,8 µM	7 ± 1 µM	> 50 µM

Parmi les sept fractions issues du premier fractionnement, ce sont les fractions D et E qui démontrent le plus grand intérêt au niveau de l'activité biologique. Respectivement, ces dernières possèdent une teneur de 37 ± 6 et de 15 ± 1 % en composés phénoliques, ces derniers étant en partie responsables des activités antioxydantes⁶⁰ (ORAC) mesurées de 13 ± 3 et de 3,7 ± 0,7 µmol équivalent Trolox/mg. Une action antifongique intéressante sur *Candida albicans* a été constatée avec des IC₉₀ respectives de 26,8 ± 0,8 et de 60,0 ± 0,6 µg/mL. À la concentration maximale non toxique, soit à 80 µg/mL, les fractions D et E inhibent respectivement 65,8 et 69,6 % de la production d'oxyde nitrique par les macrophages de souris (RAW 264.7). Pour ce qui est de l'activité cytotoxique, les deux fractions ne montrent pas de concentrations inhibitrices médianes intéressantes, ni de sélectivité envers les cellules cancéreuses (A-549 et DLD-1) par rapport aux cellules saines (WS-1). En revanche, il est pertinent de suivre la cytotoxicité pour s'assurer que la concentration toxique ne soit pas atteinte aux concentrations d'intérêt pour les autres activités biologiques.

Séparation de la fraction D

La CCM de la fraction D (Figure 8) suggère que le composé majoritaire de cette fraction est celui dont le R_f est de 0,63, soit la tache bleu clair à l'UV 254 nm et jaune vif dans le visible après révélation avec l'H₂SO₄ 20%. Une chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient isocratique de chloroforme/méthanol 90 :1 a permis d'obtenir le composé majoritaire **1** (Figure 13). La partie plus polaire de la fraction D a été fractionnée de nouveau sur HPLC

semi préparative en phase inverse (C18) (Acétonitrile-eau 15% à 100%). Plusieurs méthodes de purification ont été nécessaires pour l'obtention de composés purs. Notamment, une précipitation dans une solution à 60% méthanol/eau pour le composé 2, une chromatographie éclair sur gel de silice pour isoler le composé 3 du composé 4 ainsi qu'une autre chromatographie éclair pour départir le composé 5 de son impureté polaire. Pour la partie plus apolaire de la fraction D, une chromatographie éclair sur gel de silice isocratique au chloroforme 100% a mené à l'isolation du composé 6, tandis que la HPLC semi-préparative a été nécessaire à la purification du composé 7, ce dernier ayant une polarité très rapprochée du composé 1. En tout, sept composés purs ont été isolés à partir de la fraction D (Figure 9).

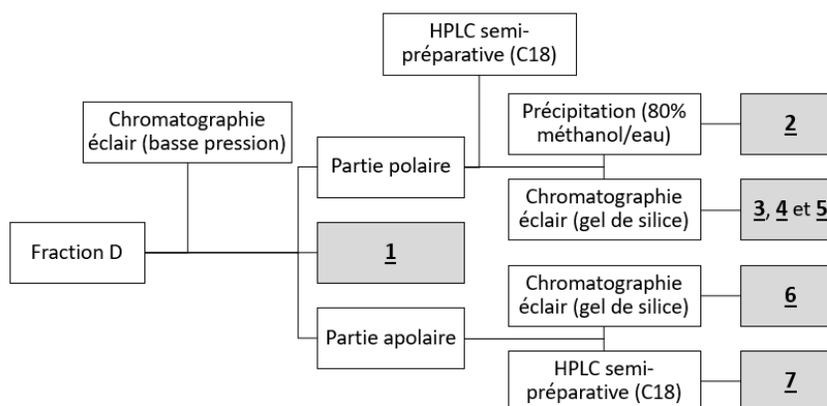


Figure 9 : Schéma de fractionnement de la fraction D

Séparation de la fraction E

La CCM de la fraction E (Figure 8) suggère que le composé majoritaire de cette fraction est celui dont le R_f est de 0,41, soit la tache la plus foncée de cette fraction à l'UV 254 nm qui devient légèrement orangée dans le visible après révélation à l'H₂SO₄ 20% dans le méthanol. Une première chromatographie éclair sur gel de silice avec différents mélanges de chloroforme et de méthanol a été utilisée pour la séparation plus grossière de la fraction E, suivie de différentes approches de purification pour l'obtention de composés purs. Notamment, une précipitation dans une solution de dichlorométhane et de méthanol 70 : 1 pour le composé 8, soit le composé majoritaire en question, une seconde chromatographie éclair sur gel de silice

pour le composé **9** et une HPLC semi-préparative pour la séparation des composés **10**, **11**, **12**, **13**, et **14**, lesquels ont une polarité similaire. En tout, sept composés ont été isolés à partir de la fraction E (Figure 10).

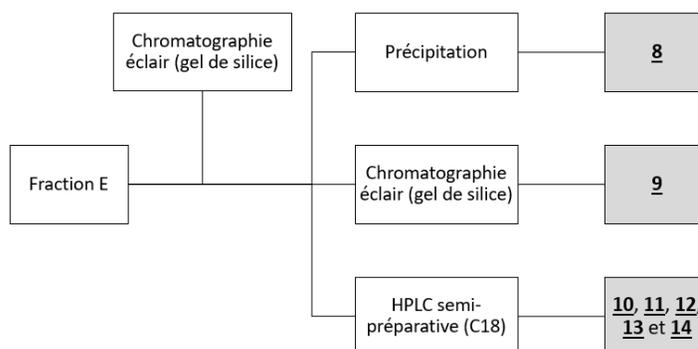


Figure 10 : Schéma de fractionnement de la fraction E

Deux composés ont finalement été isolés à partir de la fraction A par chromatographie éclair sur gel de silice, soit les composés **15** et **16**. En effet, en comparant leur comportement sur CCM ainsi que leur spectre d'absorption UV (Figure 11), ces derniers semblaient chimiquement proches des composés majoritaires **1** et **2**, respectivement. Il était donc intéressant d'isoler ces composés, malgré l'absence d'activité biologique de la fraction A, à des fins d'études des relations structure/activité de ce genre de composé.

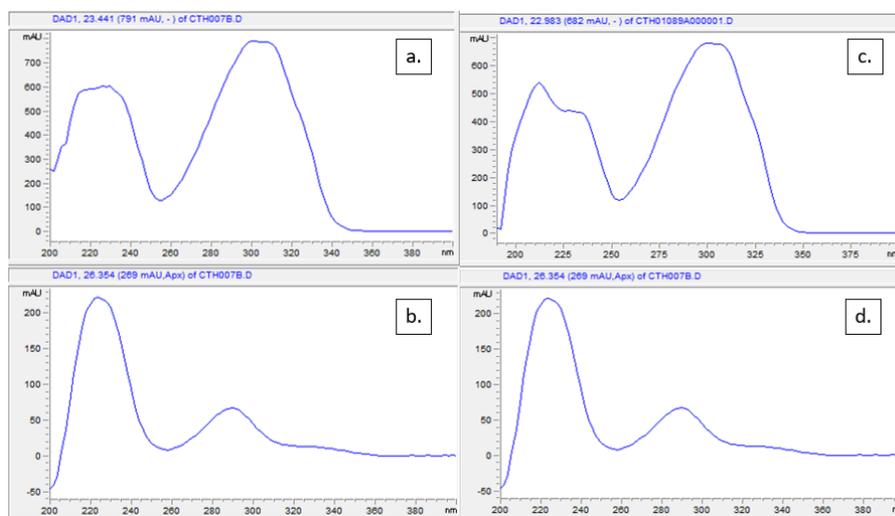


Figure 11 : Comparaison des spectres UV fournis par le détecteur DAD de l'HPLC analytique : a. spectre du composé **1**, b. spectre du composé **2**, c. spectre du composé **15** et d. spectre du composé **16**.

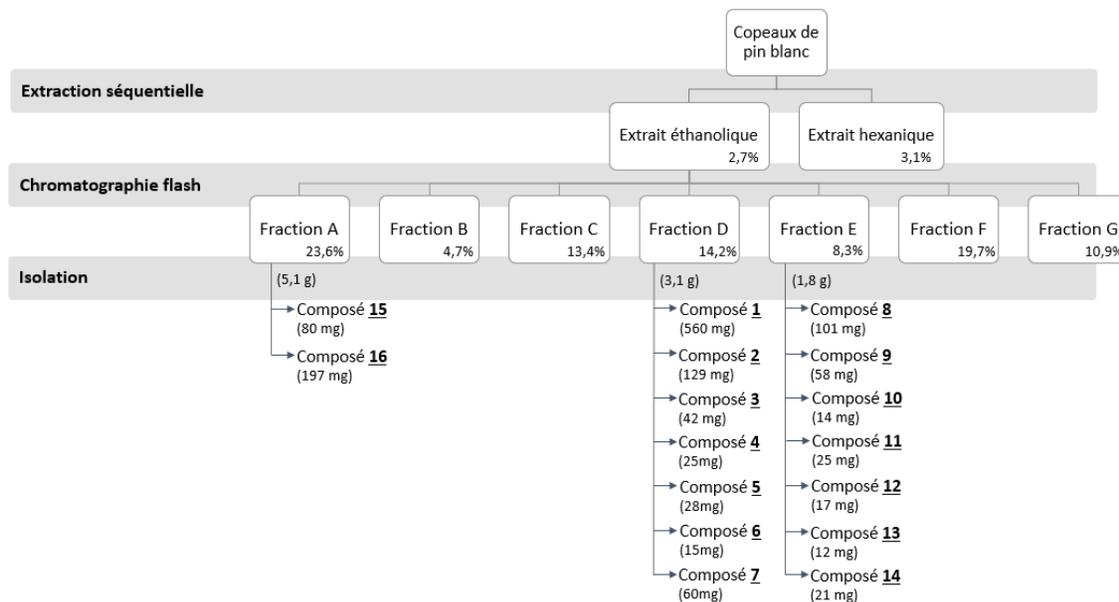


Figure 12 : Bilan du fractionnement du bois de pin blanc jusqu'aux composés isolés

2.2 Identification et caractérisation des composés isolés

La caractérisation des composés isolés comprend surtout l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire 1D et 2D et de la spectrométrie de masse. Dans le cas des composés connus dont la structure chimique possède un ou des carbones asymétriques, le pouvoir rotatoire a été mesuré et comparé aux données de la littérature afin de pouvoir identifier la stéréochimie absolue de leurs centres hétérogènes. La Figure 13 présente la structure chimique de tous les composés isolés.

2.2.1 Identification des composés isolés du bois de pin blanc

La RMN du composé 1 démontre clairement qu'il s'agit du monométhyléther de pinosylvine (Figure 14), un stilbénoloïde. Sur le spectre ^1H , on voit un doublet à 7,52 ppm et deux triplets à 7,33 et 7,23 ppm, correspondant aux protons du noyau aromatique non substitué. Le singulet à 6,60 ppm intégrant pour deux protons et celui à 6,61 ppm intégrant pour un proton représentent quant à eux les protons du second noyau aromatique. La constante de couplage de 16 Hz des deux protons de l'alcène (doublets à 7,09 et 7,04 ppm intégrant chacun pour un proton) implique qu'il s'agit de l'isomère *trans* (E), tandis que le singulet intégrant pour trois protons à 3,8 ppm confirme la présence de l'éther monométhylque

sur l'une des deux fonctions phénol de la pinosylvine. Les autres spectres RMN (^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC) coïncident également bien avec les données de la littérature⁵⁶. Ce composé a déjà été isolé chez *Pinus strobus*⁴⁸, et c'est ses activités anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques qui sont souvent mises de l'avant¹¹.

Le composé **2**, quant à lui, a été identifié comme étant de la pinocembrine (Figure 15). Cette flavanone est présente en grande quantité dans de nombreuses plantes et champignons, mais elle est principalement décrite dans le miel et la propolis comme étant un composé majoritaire révélant de nombreuses activités : antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérien et neuroprotecteur⁶¹. Le spectre RMN ^1H montre bien les signaux caractéristiques de ce composé, soit un doublet à 7,47 ppm et deux triplets à 7,40 et 7,35 ppm correspondant aux protons du noyau aromatique non substitué, ainsi que deux doublets à 5,93 ppm et 5,90 ppm pour les deux protons du second noyau aromatique. Il est aussi possible de remarquer les protons du CH_2 avec les deux doublets dédoublés à 3,06 ppm et 2,75 ppm, ces derniers se retrouvant dans un environnement chimique différent. La pinocembrine avait déjà été décrite chez *Pinus strobus*, et tous les autres spectres expérimentaux (^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC) correspondent à ceux de la littérature^{62, 63}.

Le spectre RMN ^{13}C du composé **3** montre approximativement les mêmes signaux que la pinocembrine **2**, proposant ainsi le squelette d'une flavanone, à l'exception d'un groupement méthyle en position 6 (7,0 ppm) ainsi qu'un groupement acétate en position 3 (170,7 et 20,2 ppm). Il y a donc, sur le spectre ^1H , un seul proton en position 3 (doublet à 5,81 ppm), et le proton en position 8 (5,98 ppm) devient un singulet en raison de l'absence de proton en position 6. La position de l'acétate a été confirmée par la corrélation HMBC entre le proton en position 3 (doublet à 5,81 ppm) et le carbonyle (170,7 ppm). Le déblindage du proton en position 3 suggère également que c'est à cet endroit que se retrouve l'acétate. À l'issue de ces résultats, ce composé a été identifié comme étant la 3-acétoxy-5,7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone **3** (Figure 16). Le spectre de masse en mode négatif a donné un m/z de 327,1, confirmant ainsi la formule brute de cette flavanone. Ce composé a déjà été identifié chez *Pinus morrisonicola*, le pin blanc de Taïwan⁶⁴. Il est en revanche très peu décrit dans la littérature, et c'est seulement

son spectre ^1H qui a été publié (en 1987)⁶⁵. C'est donc la première fois qu'il est identifié chez *Pinus strobus*, et que les données du spectre ^{13}C sont fournies (voir Annexe 1).

La structure du composé **4** (Figure 17) est encore plus rapprochée de celle de la pinocembrine **2** que le composé **3** ne l'était. En effet, le spectre ^1H ne comporte qu'un signal de plus, soit le singulet à 1,96 ppm intégrant pour trois protons, indiquant la présence d'un groupement méthyle sur la structure en question. Le spectre HMBC montre une forte corrélation entre ce singulet et les carbones en position 8, 9 et 10 de la flavanone, proposant ainsi que le groupement méthyle est lié à la position 8. Le spectre ^1H du composé montre l'absence de proton sur le carbone associé à cette position, confirmant ainsi l'identification de la cryptostrobine **4**. Ce composé a déjà été identifié chez *Pinus strobus*^{66, 67}. Peu d'articles récents s'intéressent à la l'activité biologique de la cryptostrobine, mis à part un qui le considère comme étant un potentiel vasodilatateur endothélium-dépendant⁶⁸.

L'analyse des spectres RMN du composé **5** a mené à l'identification d'une autre flavanone, soit la 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone (Figure 18). Le spectre ^1H montre encore une fois la présence d'un groupement méthyle (singulet intégrant pour trois protons à 1,97 ppm), mais cette fois, ce dernier est positionné sur le carbone en position 6 (105,8 ppm). En effet, le spectre HMBC montre de fortes corrélation entre les protons de ce CH_3 et les carbones des positions 5, 6 et 7. Le carbone en position 3 (73,8 ppm), quant à lui, n'est lié qu'à un seul proton. Le fait que ce dernier soit aussi déblindé suggère la présence d'un groupement hydroxyle sur cette position, conformément à l'identification finale du composé. La 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone **5** a déjà été identifié chez *Pinus morrisonicola*⁶⁵, mais pas chez *Pinus strobus*. Tout comme le composé **3**, il existe très peu de publications sur cette flavanone et les articles qui la rapportent sont assez vieux. Les spectres ^1H et ^{13}C sont donc présentés à l'Annexe 2.

Pour ce qui est du composé **6**, l'analyse des spectres RMN a permis de conclure qu'il s'agit cette fois d'une flavone. En effet, il y a une double liaison entre le carbone à la position 2 (164,16 ppm) et celui à la position 3 (105,90 ppm), ces derniers étant donc davantage déblindés. Ensuite, le spectre ^1H montre un singulet à 5,97 ppm intégrant pour trois protons

(CH₃) qui corrèle fortement avec le carbone en position 7 sur le spectre HMBC. La présence d'un groupement méthoxy en position 7 vient donc confirmer l'identification de la tectochrysin **6** (Figure 19). Il est important de noter que cette molécule semble être en beaucoup plus grande quantité dans la fraction C que dans la fraction D, dans laquelle elle a été isolée. Cette flavone a déjà été identifiée chez *Pinus strobus*⁶⁹, mais elle est beaucoup plus connue pour être en forte teneur dans le miel, la propolis et le gingembre. Plusieurs auteurs décrivent le potentiel anticancéreux⁷⁰ et anti-oxydant⁷¹ de ce composé, et une étude l'identifie même comme étant un inhibiteur puissant et spécifique de la protéine ABCG2, cette dernière étant connue pour induire une résistance des cellules cancéreuses face à plusieurs médicaments⁷².

La caractérisation du composé **7** a permis d'identifier une molécule dont la structure est très rapprochée du composé **1**, soit le monométhyléther de dihydropinosylvine **7** (Figure 20). Ce dernier n'appartient cependant pas à la famille des stilbénoides en raison de l'absence de double liaison entre les carbones en position 7 et 8. Ces derniers sont également davantage blindés sur le spectre ¹³C, avec des déplacements chimiques respectifs de 38,6 ppm et de 38,2 ppm. Il est également facile de différencier ces deux composés par la présence de ces deux CH₂ sur le spectre DEPT du composé **7**. Le m/z est également plus élevé de deux unités avec une valeur expérimentale mesurée de 227,3 en mode négatif. Il est également intéressant de noter l'apparence cristalline de ce composé, en comparaison aux stilbénoides qui sont plutôt des semi-solides. Le monométhyléther de dihydropinosylvine **7** a déjà été identifié chez *Pinus strobus*, et tous les spectres RMN correspondent avec ceux présentés dans la littérature⁶². Bien que certains articles démontrent l'activité biologique de cette molécule⁷³, l'activité est généralement moins intéressante que pour le monométhyléther de pinosylvine **1**. En effet, la double liaison conjuguée entre les deux noyaux aromatiques est notamment importante pour la propriété de résonance qui contribue au pouvoir antioxydant des stilbénoides, mais cette liaison participe également à d'autres types d'activités comme les propriétés anticancéreuses de cette famille, la réduction de cette liaison diminuant jusqu'à 100 fois la puissance contre les cellules cancéreuses⁴³.

Les spectres RMN du composé **8** montrent clairement la structure d'une autre flavone, avec la double liaison caractéristique entre les carbones en position 2 et 3 de ce flavonoïde. La structure de ce composé est très semblable à celle de la tectochrysinine **6**, mais l'absence de singulet intégrant pour trois protons sur le spectre ^1H ainsi que l'absence du carbone correspondant sur le spectre ^{13}C impliquent que l'oxygène lié sur le carbone en position 7 n'est cette fois pas méthylé. À l'issue de tous ces résultats, l'analyse des spectres a mené à l'identification de la chrysinine **8** (Figure 21), une flavone très étudiée dans le miel, la propolis et la passiflore bleue. Il est intéressant de noter la difficulté à solubiliser ce composé dans d'autres solvants que le DMSO, d'où la facilité de l'isoler par précipitation. La chrysinine **8** a déjà été identifiée chez *Pinus strobus*^{66, 69}, et plusieurs études *in vitro* (et même certaines *in vivo*) ont confirmé les effets thérapeutiques de la chrysinine causés entre autres par ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antivirales³⁴.

La caractérisation du composé **9** indique que sa structure est la même que celle du composé **3**, mis à part qu'il n'est pas méthylé en position 3. Il a donc été possible de conclure l'identification de la 3-acétate-pinobanksine **9** (Figure 22), une flavanone qui a déjà été identifiée dans d'autres espèces de pin, comme chez *Pinus pinaster*⁷⁴ et chez *Pinus banksiana*³⁷, mais pas encore chez *Pinus strobus*. Il existe plusieurs publications qui mentionnent l'identification de ce composé chez plusieurs plantes, mais son activité biologique est rarement mise de l'avant, contrairement à la pinobanksine.

Les composés **10**, **11** et **12** appartiennent quant à eux à la famille des acides résiniques. La structure des acides résiniques est caractérisée par la présence d'un acide carboxylique en position 18 ou 19. L'analyse des spectres RMN et la comparaison avec les données spectroscopiques de la littérature ont permis d'identifier l'acide 7-oxo-dihydroabiétique **10**⁷⁵ (Figure 23), l'acide 12-hydroxyabiétique **11**⁷⁶ (Figure 24) et l'acide 7-oxo-13-isopimara-8,15-diène-18-oïque **12**⁷⁷ (Figure 25). Ces trois composés ont déjà été identifiés chez plusieurs espèces du genre *Pinus*⁷⁸⁻⁸⁰, mais aucune donnée sur leur présence dans le *Pinus strobus* n'a été trouvée. Une activité cytotoxique significative a déjà été décrite pour l'acide 7-oxo-dihydroabiétique **10**, avec un IC_{50} de 10,2 $\mu\text{g/mL}$ contre les cellules

tumorales QGY-7703⁸¹. L'activité anticancéreuse de l'acide 12-hydroxyabiétique **11** a également été rapportée⁸², mais l'action était beaucoup moins efficace que celle de l'acide abiétique non hydroxylé. Néanmoins, les quantités isolées ne permettront pas de tester l'activité biologique de ces acides résiniques dans le cadre de ces travaux de maîtrise.

Les composés **13** et **14** sont des monoglycérides dont la position 1 du glycérol est reliée, respectivement, à un acide pinolénique (18 :3 ω 5) (Figure 26) et à un acide linoléique (18 :2 ω 9) (Figure 27). En effet, dans les deux cas, le spectre RMN HMBC montre bien la corrélation entre l'alcool primaire du glycérol et le carbone quaternaire de l'ester (175 ppm). Une expérience RMN HSQC Band selective 10 ppm (125-135 ppm) a permis de confirmer les constantes de couplage de 11,3 Hz sur l'ensemble des protons compris dans le multiplet à 5,4 ppm, confirmant ainsi l'isomère *cis* (Z) sur toutes les liaisons doubles de ces deux composés. Le monoglycéride d'acide linoléique **14** est un composé bien connu dont les données RMN sont déjà rapportées dans la littérature⁸³. En revanche, il est très peu identifié chez le genre *Pinus* en général. Pour ce qui est du monoglycéride d'acide pinolénique **13**, c'est la première fois qu'il est isolé comme produit naturel. L'acide pinolénique est un composé très abondant chez les pins (notamment dans les cônes où il représente 14 à 19 % de la composition en acide gras) dont l'activité anti-inflammatoire a déjà été décrite⁸⁴. La quantité isolée de son monoglycéride est cependant insuffisante pour tester l'activité biologique de ce dernier. L'ensemble des expériences RMN 1D et 2D du composé **13** sont présentées à l'Annexe 3.

Un deuxième stilbène a été isolé, soit le diméthyléther de pinosylvine **15** (Figure 28). Ce deuxième groupement méthoxy, par rapport au monométhyléther de pinosylvine **1**, engendre une symétrie au sein du cycle aromatique trisubstitué, ce qui explique pourquoi, sur les spectres RMN, les signaux des positions 5 et 6 ne sont plus distincts de ceux des positions 3 et 2, respectivement. L'absence de groupement OH implique également qu'il faut analyser ce stilbène en mode positif sur le LCMS. Ce composé a déjà été identifié chez *Pinus strobus*⁸⁵, et il est connu que son activité biologique est beaucoup moins intéressante que celle du monométhyléther de pinosylvine **1**¹². Il sera tout de même intéressant de confirmer la relation structure-activité de ces derniers.

Les spectres RMN du composé **16** sont presque identiques à ceux de la pinocembrine **2**, à l'exception d'un carbone supplémentaire à 55,7 ppm sur le spectre ^{13}C et des trois protons représentés par le singulet à 3,81 ppm sur le spectre ^1H . La corrélation HMBC entre ces protons et le carbone en position 7 de la flavanone permet de confirmer l'identification de la pinostrobine **16** (Figure 29), les résultats étant également représentatifs de ceux fournis dans la littérature⁸⁶. Ce composé, dont l'activité anti-inflammatoire, anticancéreuse, antivirale et antioxydante ont été décrites, a déjà été identifié chez *Pinus strobus*⁸⁷.

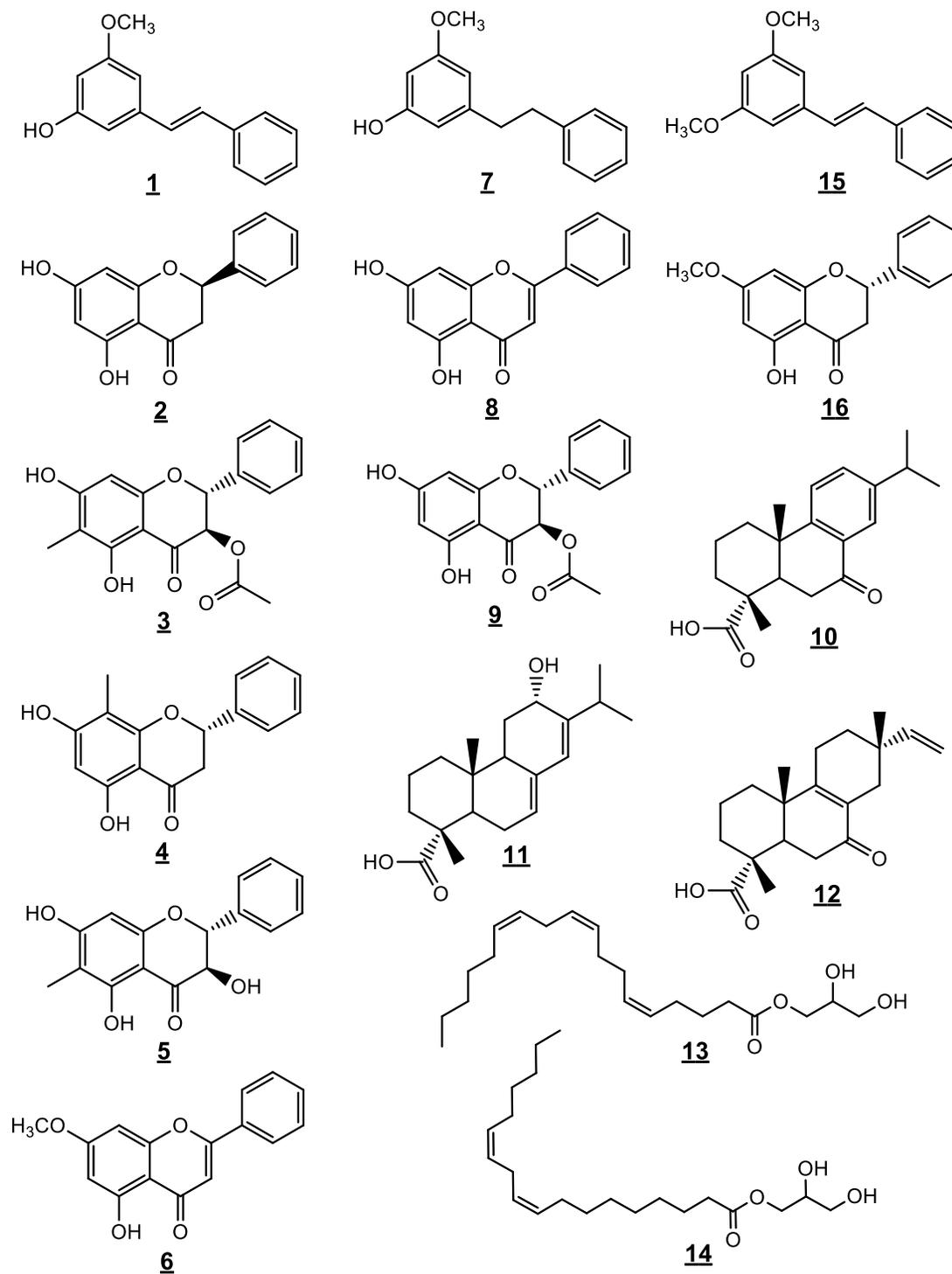


Figure 13 : Structure des composés isolés de l'extrait éthanolique de bois de pin blanc

2.2.2 Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés

Monométhyléther de pinosylvine 1

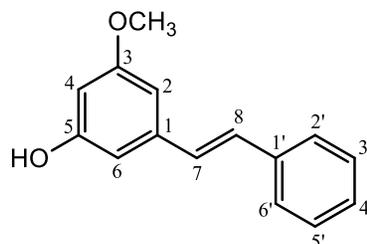


Figure 14 : Structure du monométhyléther de pinosylvine 1

Semi-solide marron, m/z 225,1 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{15}H_{14}O_2$, 226,0994). Rf 0,63 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 40 :1)

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 162,6 (C-3), 159,8 (C-5), 140,8 (C-1), 138,8 (C-1'), 129,9 (C-7), 129,8 (C-8), 129,7 (C-3',5'), 128,6 (C-4'), 127,5 (C-2',6'), 107,0 (C-6), 104,7 (C-2), 101,9 (C-4), 55,7 (C-3-OCH₃).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,52 (d, J = 7,68 Hz, 2H, H-2',6'), 7,33 (t, J = 7,68 Hz, 2H, H-3',5'), 7,23 (t, J = 7,06 Hz, 1H, H-4'), 7,09 (d, J = 16,09 Hz, 1H, H-8), 7,04 (d, J = 16,09 Hz, 1H, H-7), 6,61 (s, 1H, H-2), 6,60 (s, 1H, H-6), 3,78 (s, 3H, H-3-OCH₃).

Pinocembrine 2

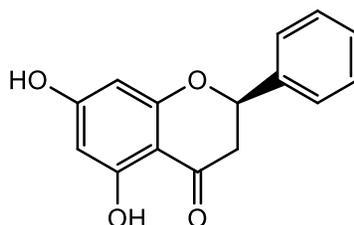


Figure 15 : Structure de la (-)-pinocembrine 2

Poudre blanche verdâtre, ; $[\alpha]_D - 56,189^\circ$ (MeOH ; c 0,719 g/100mL ; 22°C), m/z 254,8 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{15}H_{12}O_4$, 256,0736), Rf 0,41 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 40 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 197,3 (C-4), 168,4 (C-7).165,5 (C-5), 164,6 (C-9), 140,4 (C-1'), 129,7 (C-3',5'), 129,6 (C-4'), 127,3 (2',6'), 103,4 (C-10), 97,2 (C-6), 96,2 (C-8), 80,4 (C-2), 44,2 (C-3).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,47 (d, $J = 7,50$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,40 (t, $J = 7,25$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,35 (t, $J = 7,30$ Hz, 1H, H-4'), 5,93 (d, $J = 1,99$ Hz, 1H, H-8), 5,90 (d, $J = 2,10$ Hz, 1H, H-6), 5,42 (dd, $J = 12,8, 3,0$ Hz, 1H, H-2), 3,06 (dd, $J = 17,2, 12,8$ Hz, 1H, H-3), 2,75 (dd, $J = 17,1, 3,0$ Hz, 1H, H-3).

3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone **3**

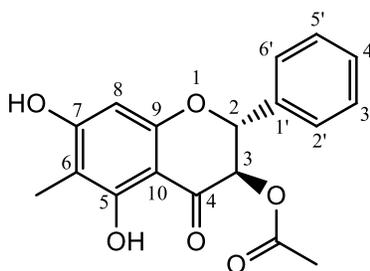


Figure 16 : Structure de la (+)-3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone **3**

Poudre blanchâtre, $[\alpha]_D + 49,869^\circ$ (MeOH ; c 0,383 g/100mL ; 22°C), m/z 327,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$, 328,0947), Rf 0,77 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 60 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 193,0 (C-4), 170,7 (3-CO), 166,8 (C-7).162,5, (C-5), 161,5 (C-9), 137,3 (C-1'), 130,3 (C-4'), 129,6 (C-3',5'), 128,6 (2',6'), 106,3 (C-6), 101,8 (C-10), 95,6 (C-8), 82,4 (C-2), 73,8 (C-3), 20,2 (3-COCH₃), 7,0 (6-CH₃).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,50 (m, 2H, H-2',6'), 7,41 (m 2H, H-3',5'), 7,39 (m, 1H, H-4'), 5,98 (s, 1H, H-8), 5,81 (d, $J = 11,77$ Hz, 1H, H-3), 5,33 (d, $J = 11,77$ Hz, 1H, H-2), 1,96 (s, 3H, H-3-COCH₃), 1,95 (s, 3H, H-6-CH₃).

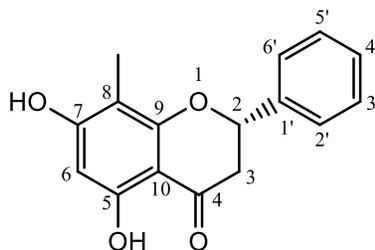
Cryptostrobin **4**

Figure 17 : Structure de la (-)-cryptostrobin **4**

Poudre blanchâtre, $[\alpha]_D - 49,398^\circ$ (MeOH ; c 0,083 g/100mL ; 22°C), m/z 269,1 [M-H]⁻ (calculé pour C₁₆H₁₄O₄, 270,0892), Rf 0,57 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 60 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 197,7 (C-4), 166,5 (C-7).163,0 (C-5), 161,4 (C-9), 140,7 (C-1'), 129,7 (C-3',5'), 129,5 (C-4'), 127,2 (2',6'), 104,7 (C-8), 103,3 (C-10), 96,3 (C-6), 80,1 (C-2), 44,1 (C-3), 7,7 (C-8-CH₃).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,52 (d, J = 7,40 Hz, 2H, H-2',6'), 7,43 (t, J = 7,20 Hz, 2H, H-3',5'), 7,37 (t, J = 7,40 Hz, 1H, H-4'), 5,95 (s, 1H, H-6), 5,45 (dd, J = 12,7, 3,0 Hz, 1H, H-2), 3,05 (dd, J = 17,1, 12,7 Hz, 1H, H-3), 2,29 (dd, J = 17,1, 2,9 Hz, 1H, H-3), 1,96 (s, 3H, H-8-CH₃).

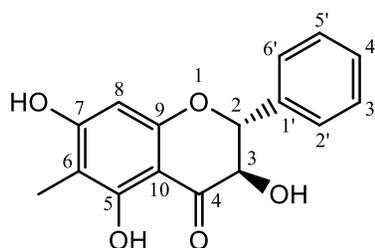
3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone **5**

Figure 18 : Structure de la (+)-3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone **5**

Poudre marron, $[\alpha]_D + 13,253^\circ$ (MeOH ; c 0,083 g/100mL ; 22°C), m/z 285,1 [M-H]⁻ (calculé pour C₁₆H₁₄O₅, 286,0841), Rf 0,62 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 60 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 198,3 (C-4), 166,6 (C-7).162,4 (C-5), 161,9 (C-9), 138,7 (C-1'), 129,9 (C-4'), 129,4 (C-3',5'), 128,9 (2',6'), 105,8 (C-6), 101,5 (C-10), 95,4 (C-8), 85,1 (C-2), 73,8 (C-3), 7,0 (C-6- CH_3).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,53 (d, $J = 6,98$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,42 (t, $J = 6,70$ Hz, 2H, H-3',5'), 7,38 (t, $J = 6,98$ Hz, 1H, H-4'), 5,94 (s, 1H, H-8), 5,04 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, H-2), 4,53 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, H-3), 1,97 (s, 3H, H-6- CH_3).

Tectochrysin **6**

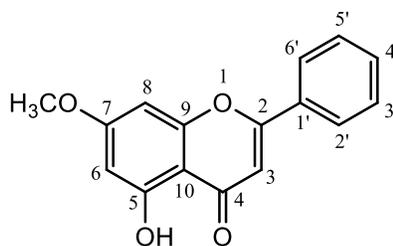
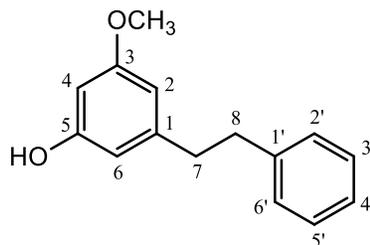


Figure 19 : Structure de la tectochrysin **6**

Poudre blanchâtre, m/z 267,0 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$, 268,0736). Rf 0,88 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 40 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 182,66 (C-4), 165,8 (C-7).164,2 (C-2), 162,4 (C-5), 158,0 (C-9), 132,0 (C-3',5'), 131,5 (C-1'), 129,2 (C-4'), 126,5 (C-2',6'), 106,1 (C-10), 105,9 (C-3), 98,4 (C-6), 92,9 (C-8), 55,97 (C-7- OCH_3).

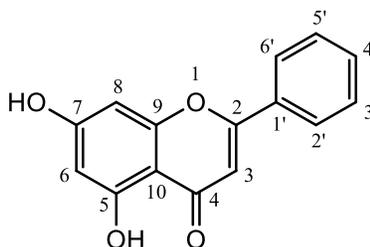
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 12,73 (s, 1H, H-5-OH), 7,90 (d, $J = 7,31$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,55 (m, 2H, H-3',5'), 7,53 (m, 1H, H-4'), 6,68 (s, 1H, H-3), 6,51 (d, $J = 2,01$ Hz, 1H, H-8), 6,39 (d, $J = 2,01$ Hz, 1H, H-6), 3,89 (s, 3H, H-7- OCH_3).

Monométhyléther de dihydropinosylvine 7**Figure 20** : Structure du monométhyléther de dihydropinosylvine 7

Poudre brunâtre, m/z 227,2 [M-H]⁻ (calculé pour C₁₅H₁₆O₂, 228,1150). Rf 0,44 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 60 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 161,3 (C-3), 158,5 (C-5), 144,8 (C-1), 142,3 (C-1'), 128,9 (C-2',6'), 128,7 (C-3',5'), 126,3 (C-4'), 108,7 (C-6), 106,2 (C-2), 99,5 (C-4), 55,4 (C-3-OCH₃), 38,6 (C-7), 38,2 (C-8).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,20 (t, J = 7,6 Hz, 2H, H-3',5'), 7,12 (m, 3H, H-2',4',5'), 6,25 (t, J=1,9 Hz, 1H, H-6), 6,20 (t, J=2,1 Hz, 1H, H-4), 6,19 (t, J=2,0 Hz, 1H, H-2), 3,67 (s, 3H, H-3-OCH₃), 2,82 (dd, J=9,5, 6,2 Hz, 1H, H-8), 2,76 (dd, J=9,5, 6,2 Hz, 1H, H-7).

Chrysine 8**Figure 21** : Structure de la chrysine 8

Poudre jaune, m/z 252,9 [M-H]⁻ (calculé pour C₁₅H₁₀O₄, 254,0579). Rf 0,30 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 30 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, (CD₃)₂SO) δ 182,0 (C-4), 166,9 (C-7), 163,3 (C-2), 161,9 (C-5), 158,1 (C-9), 132,4 (C-4'), 131,3 (C-1'), 129,6 (C-3',5'), 126,8 (C-2',6'), 105,6 (C-3), 103,8 (C-10), 99,9 (C-6), 94,9 (C-8).

RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12,80 (s, 1H, H-5-OH), 8,06 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-2',6'), 7,60 (m, 2H, H-3',5'), 7,56 (m, 1H, H-4'), 6,92 (s, 1H, H-3), 6,44 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-8), 6,15 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-6).

3-acétate pinobanksine **9**

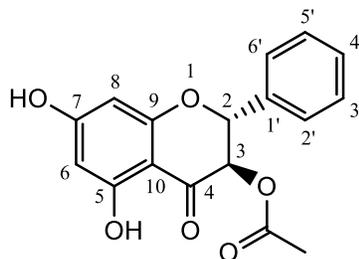


Figure 22 : Structure de la (+)-3-acétate-pinobanksine **9**

Poudre marron, $[\alpha]_D + 45,726^\circ$ (MeOH ; c 0,468 g/100mL ; 22°C), m/z 313,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 314,0790), Rf 0,44 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 40 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 192,9 (C-4), 170,7 (3-CO), 169,1 (C-7).165,4, (C-9), 164,0 (C-5), 137,1 (C-1'), 130,4 (C-4'), 129,6 (C-3',5'), 128,6 (2',6'), 102,1 (C-10), 97,8 (C-8), 96,7 (C-6), 82,4 (C-2), 73,7 (C-3), 20,1 (3-COCH₃).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,50 (m, 2H, H-2',6'), 7,41 (m 2H, H-3',5'), 7,39 (m, 1H, H-4'), 5,97 (d, $J=1,4$ Hz, 1H, H-8), 5,94 (d, $J=1,4$ Hz, 1H, H-6), 5,82 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H, H-3), 5,37 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H, H-2), 1,95 (s, 3H, H-3-COCH₃).

Acide 7-oxo-dihydroabiétique **10**

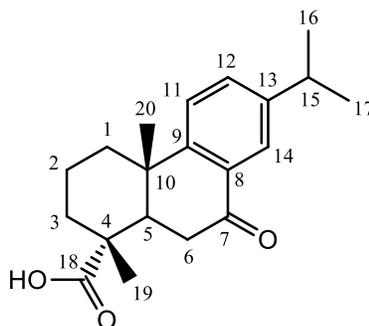


Figure 23 : Structure de l'acide (+)-7-oxo-dihydroabiétique **10**

Huile jaunâtre, $[\alpha]_D + 45,416^\circ$ (MeOH ; c 0,068 g/100mL ; 22°C), m/z 315,4 [M+H]⁺ (calculé pour C₂₀H₂₆O₃, 314,1882), Rf 0,3 (gel de silice 60 F₂₅₄ CHCl₃/CH₃OH 15 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 200,9 (C-7), 181,5 (C-18), 155,1 (C-9), 148,2 (C-13), 134,1 (C-12), 131,6 (C-8), 125,6 (C-14), 125,1 (C-11), 47,6 (C-4), 45,5 (C-5), 38,9 (C-2), 38,6 (C-10), 38,5 (C-1), 38,0 (C-3), 34,8 (C-15), 24,2 (C-16,17), 23,8 (C-20), 19,2 (C-6), 16,9 (C-19).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,81 (d, J=2,0 Hz, 1H, H-14), 7,49 (dd, J=2,0, 8,1 Hz, 1H, H-12), 7,40 (d, J=8,1 Hz, 1H, H-11), 2,93 (sept, J=6,8 Hz, 1H, H-15), 2,79 (dd, J=14,3, 14,3 Hz, 1H, H-2), 2,65 (d, J=14,3 Hz, 1H, H-5), 2,43 (m, 1H, H-1), 2,38 (m, 1H, H-2), 1,85 (m, 2H, H-6), 1,79 (m, 2H, H-3), 1,60 (dd, J=2,8, 14,3 Hz, 1H, H-1), 1,35 (s, 3H, H-19), 1,28 (s, 3H, H-20), 1,27 (d, J=6,8 Hz, 6H, H-16,17).

Acide 12-hydroxyabiétique **11**

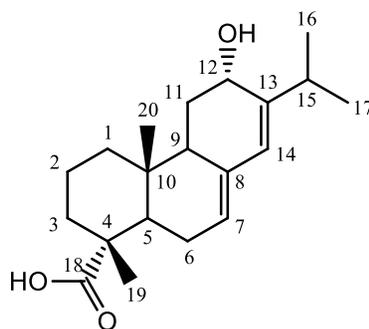


Figure 24 : Structure de l'acide (+)-12-hydroxyabiétique **11**

Huile jaunâtre, $[\alpha]_D + 40,112^\circ$ (MeOH ; c 0,125 g/100mL ; 22°C), m/z 319,1 [M+H]⁺ (calculé pour C₂₀H₃₀O₃, 318,2195), Rf 0,3 (gel de silice 60 F₂₅₄ CHCl₃/CH₃OH 15 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, (CD₃)₂SO) δ 180,1 (C-18), 145,2 (C-13), 135,3 (C-8), 124,3 (C-14), 122,9 (C-7), 64,6 (C-12), 45,8 (C-4), 45,2 (C-5), 43,7 (C-9), 38,2 (C-1), 37,4 (C-3), 33,9 (C-10), 32,1 (C-15), 31,2 (C-11), 25,8 (C-6), 22,7 (C-16), 22,0 (C-17), 18,2 (C-2), 17,3 (C-19), 14,6 (C-20).

RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 5,72 (s, 1H, H-14), 5,46 (m, 1H, H-7), 4,08 (t, $J=3,0$, 1H, H-12), 2,35 (sept, $J=6,5$ Hz, 1H, H-15), 2,26 (d, $J=13,3$, 1H, H-9), 2,02 (m, 1H, H-5), 1,99 (m, 1H, H-6), 1,79 (m, 1H, H-1), 1,76 (m, 1H, H-6), 1,70 (m, 1H, H-11), 1,66 (m, 1H, H-3), 1,56 (m, 1H, H-3), 1,52 (m, 1H, H-2), 1,17 (m, 1H, H-11), 1,14 (s, 3H, H-19), 1,06 (m, 1H, H-1), 1,03 (d, $J=6,6$ Hz, 3H, H-17), 0,99 (d, $J=6,6$ Hz, 3H, H-16), 0,73 (s, 3H, H-20).

Acide 7-oxo-13-isopimara-8,15-diène-18-oïque **12**

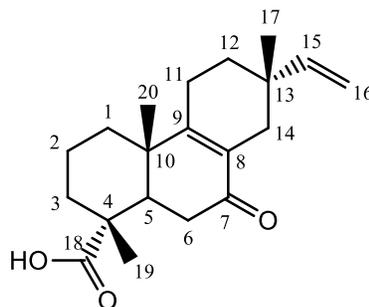


Figure 25 : Structure de l'acide (+)-7-oxo-13-isopimara-8,15-diène-18-oïque **12**

Huile blanchâtre, $[\alpha]_D + 70,152^\circ$ (MeOH ; c 0,087 g/100mL ; 22°C), m/z 317,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$, 316,2038), R_f 0,32 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 15 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 200,0 (C-7), 180,4 (C-18), 167,0 (C-9), 144,9 (C-15), 128,5 (C-8), 110,7 (C-16), 47,7 (C-4), 44,8 (C-5), 39,1 (C-10), 36,6 (C-6), 36,3 (C-3), 34,5 (C-1), 34,1 (C-13), 33,2 (C-12), 32,9 (C-14), 27,1 (C-17), 22,6 (C-2), 17,5 (C-11), 16,8 (C-20), 15,6 (C-19).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 5,74 (dd, $J=11,0, 17,5$ Hz, 1H, H-15), 4,97 (dd, $J=11,0, 1,3$ Hz, 1H, H-16), 4,88 (dd, $J=11,0, 1,3$ Hz, 1H, H-16), 2,55 (t, $J=14,1$ Hz, 1H, H-6), 2,48 (d, $J=14,1$ Hz, 1H, H-5), 2,35 (m, 1H, H-14), 2,31 (m, 2H, H-2), 2,16 (d, $J=16,3$ Hz, 2H, H-6), 1,98 (m, 1H, H-14), 1,92 (m, 1H, H-1), 1,80 (m, 1H, H-3), 1,78 (m, 1H, H-11), 1,68 (m, 1H, H-3), 1,66 (m, 1H, H-11), 1,64 (m, 1H, H-12), 1,38 (m, 1H, H-12), 1,31 (m, 1H, H-1), 1,29 (s, 3H, H-19), 1,19 (s, 3H, H-20), 1,03 (s, 3H, H-17).

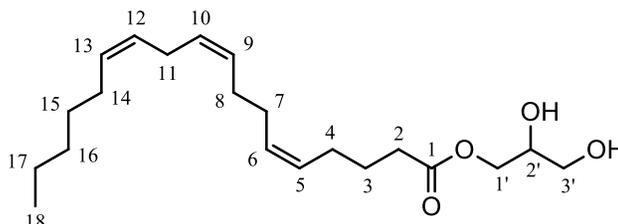
1-monoglycérade d'acide pinolénique **13**

Figure 26 : Structure du (+)-1-monoglycérade d'acide pinolénique **13**

Huile jaunâtre, $[\alpha]_D + 3,750^\circ$ (MeOH ; c 0,080 g/100mL ; 22°C), m/z 121,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ (glycérol), 120,0423) 352,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_4$, 352,2614), 396,9 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_4 + 44,9712$, 397,2326). R_f 0,27 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 15 : 1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 175,3 (C-1), 131,3 (C-9), 131,0 (C-13), 130,2 (C-5), 130,1 (C-6), 129,6 (C-10), 129,0 (C-12), 71,2 (C-2'), 66,5 (C-1'), 64,1 (C-3'), 34,3 (C-2), 32,7 (C-16), 30,5 (C-15), 28,4 (C-8), 28,3 (C-7), 28,2 (C-14), 27,6 (C-4), 26,6 (C-11), 26,0 (C-3), 23,6 (C-17), 14,4 (C-18).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 5,40 (m, (J=11,3 Hz en HSQC « band selective ») 6H, H-9,6,5,13,10,12), 4,17 (dd, J=4,4, 11,4 Hz, 1H, H-1'), 4,08 (dd, J=6,3, 11,4 Hz, 1H, H-1'), 3,84 (c, J=5,6, 10,9 Hz, 1H, H-2'), 3,57 (dd, J=2,5, 5,4 Hz, 2H, H-3'), 2,81 (t, J=6,5 Hz, 2H, H-11), 2,38 (t, J=7,5 Hz, 2H, H-2), 2,11 (m, 8H, H-8,7,4,14), 1,70 (c, J=7,5, 14,7 Hz, 2H, H-3), 1,39 (c, J=7,2, 14,2 Hz, 2H, H-15), 1,34 (m, 2H, H-17), 1,32 (m, 2H, H-16), 0,93 (t, J=6,4 Hz, 3H, H-18).

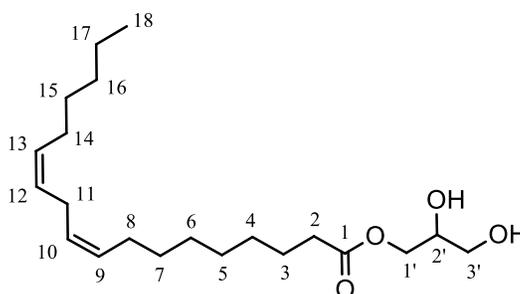
1-monoglycérade d'acide linoléique **14**

Figure 27 : Structure du (+)-1-monoglycérade d'acide linoléique **14**

Huile jaunâtre, $[\alpha]_D + 2,190^\circ$ (MeOH ; c 0,087 g/100mL ; 22°C), m/z 121,2 $[M+H]^+$ (calculé pour C₄H₈O₄ (glycérol), 120,0423), 396,6 $[M+ACN+H]^+$ (calculé pour C₂₁H₃₈O₄ + 42,0338, 396,3108). Rf 0,27 (gel de silice 60 F₂₅₄ CHCl₃/CH₃OH 15 :1).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 175,4 (C-1), 130,9 (C-13,9), 129,1 (C-12), 129,0 (C-10), 71,1 (C-2'), 66,5 (C-1'), 64,1 (C-3'), 34,9 (C-2), 32,7 (C-16), 30,7 (C-15), 30,5 (C-7), 30,3 (C-6), 30,2 (C-5), 30,1 (C-4), 28,2 (C-14), 28,1 (C-8), 26,5 (C-11), 26,0 (C-3), 23,6 (C-17), 14,4 (C-18).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 5,37 (m, (J=11,3 Hz en HSQC « band selective ») 4H, H-9,13,10,12), 4,17 (dd, J=4,4, 11,4 Hz, 1H, H-1'), 4,08 (dd, J=6,3, 11,4 Hz, 1H, H-1'), 3,84 (c, J=5,6, 10,9 Hz, 1H, H-2'), 3,57 (dd, J=2,5, 5,4 Hz, 2H, H-3'), 2,80 (t, J=6,5 Hz, 2H, H-11), 2,38 (t, J=7,5 Hz, 2H, H-2), 2,09 (m, 4H, H-8,14), 1,64 (c, 7,5, 14,7 Hz, 2H, H-3), 1,37 (m, 14H, H-4-7, 15-16), 0,93 (t, J=6,3 Hz, 3H, H-18).

Diméthyléther de pinosylvine **15**

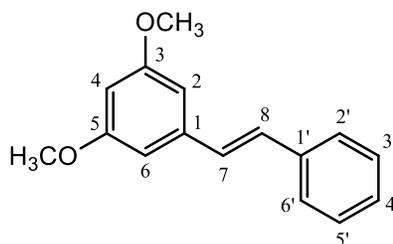


Figure 28 : Structure du diméthyléther de pinosylvine **15**

Semi-solide blanchâtre, m/z 241,3 $[M+H]^+$ (calculé pour C₁₆H₁₆O₂, 240,1150), Rf 0,61 (gel de silice 60 F₂₅₄ C₆H₁₄/C₄H₈O₂ 9 :1)

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,0 (C-3,5), 139,4 (C-1), 137,2 (C-1'), 129,3 (C-8), 128,7 (C-7,3',5'), 127,8 (C-4'), 126,6 (C-2',6'), 104,6 (C-2,6), 100,1 (C-4), 55,4 (C-3-OCH₃, 6-OCH₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (d, J = 7,63 Hz, 2H, H-2',6'), 7,41 (t, J = 7,48 Hz, 2H, H-3',5'), 7,33 (t, J = 7,48 Hz, 1H, H-4'), 7,15 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8), 7,09 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7), 6,73 (d, J=2,1 Hz, 2H, H-2,6), 6,46 (t, J=2,1 Hz, 1H, H-4), 3,89 (s, 6H, H-3-OCH₃, 6-OCH₃).

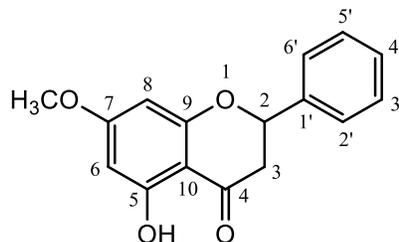
Pinostrobine **16**

Figure 29 : Structure de la (-)-pinostrobine **16**

Poudre blanchâtre, ; $[\alpha]_D - 40,768^\circ$ (MeOH ; c 0,937 g/100mL ; 22°C), m/z 269,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 270,0892), Rf 0,44 (gel de silice 60 F₂₅₄ $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 9 :1).

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 195,8 (C-4), 168,0 (C-7).164,2 (C-5), 162,8 (C-9), 138,4 (C-1'), 128,9 (C-3',4',5'), 126,2 (2',6'), 103,2 (C-10), 95,2 (C-6), 94,3 (C-8), 79,3 (C-2), 55,7 (C-7-OCH₃), 43,4 (C-3).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 12,02 (s, 1H, H-5-OH), 7,45 (m, 2H, H-2',6'), 7,44 (m, 2H, H-3',5'), 7,39 (m, 1H, H-4'), 6,08 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-6), 6,06 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-8), 5,42 (dd, J = 3,1, 13,0 Hz, 1H, H-2), 3,81 (s, 3H, H-7-OCH₃), 3,09 (dd, J = 13,0, 17,1 Hz, 1H, H-3), 2,82 (dd, J = 17,1, 3,0 Hz, 1H, H-3).

2.2.3 Activités biologiques des composés

Les activités biologiques décrites dans cette section ont été testés sur le monométhyléther de pinosylvine **1**, la pinocembrine **2**, le dihydromonométhyl éther de pinosylvine **7**, la chrysine **8**, le diméthyléther de pinosylvine **15** et la pinostrobine **16**. Ces composés ont été choisis en raison de la quantité isolée, de leur abondance dans les fractions actives ou encore à des fins d'étude de la relation structure/activité.

Pour ce qui est de l'activité antioxydante (Tableau 8), quatre des six composés testés présentent un indice ORAC comparable à celui de la quercétine (21 ± 4 $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$), utilisée comme contrôle positif dans l'expérience : 18 ± 1 $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ pour le monométhyléther de pinosylvine **1**, $17,3 \pm 0,1$ $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ pour la pinocembrine **2**, $17,2 \pm 0,1$ $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ pour le

dihydro monométhyléther de pinosylvine **7** et 15 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ pour le diméthyléther de pinosylvine **15**. En considérant l'indice ORAC de 13 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ (Tableau 4) de la fraction mère D, il est valable de noter que son efficacité antioxydante repose en majeure partie sur la présence des composés **1**, **2** et **7**. À l'inverse, l'indice ORAC du composé **15** n'est pas reflété par sa fraction mère, ce qui laisse supposer qu'il ne représente pas un pourcentage assez important de la composition de la fraction A pour lui conférer cette activité biologique.

À l'issue de ces résultats ORAC, il est intéressant de constater que l'absence de la double liaison du monométhyléther de pinosylvine **1**, ou encore que la méthylation du second groupement hydroxy, ne semble pas influencer significativement son pouvoir antioxydant. D'autre part, les indices ORAC de la chrysine **8** et de la pinostrobinine **16** sont faibles comparativement aux autres composés testés, suggérant que la méthylation du groupement hydroxy en position 7 de la pinocembrine **2**, ou encore que la présence d'une double liaison entre les carbones en position 2 et 3 (flavone), exercent une influence négative sur le potentiel antioxydant.

Malgré une démonstration d'un potentiel antioxydant dans la plateforme ORAC, le Tableau 8 montre également l'absence d'efficacité antioxydante dans le modèle cellulaire pour ce qui est des composés **1**, **2**, **7** et **15**, avec des IC_{50} toujours supérieurs à $100 \mu\text{M}$. En effet, même si leur indice ORAC était très rapprochés de celui de la quercétine, ils sont tous inefficaces dans le modèle cellulaire, tandis que la quercétine montre une action relativement forte (IC_{50} de $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Pourtant, si l'on prend l'exemple de la pinocembrine **2**, sa structure possède plusieurs similarités avec la quercétine (Figure 30). Une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène est la faible solubilité et biodisponibilité de la pinocembrine **2**, ce qui peut effectivement impacter son pouvoir antioxydant dans ce type de modèle⁸⁸. La quercétine, quant à elle, possède trois groupes hydroxy supplémentaires augmentant ainsi sa polarité de façon significative par rapport à la pinocembrine **2**.

aureus) a également été testée employant la même méthode que celle utilisée pour l'activité antifongique, mais les résultats n'étaient pas concluants.

Tableau 9 : Activité antifongique sur *Candida albicans* des composés purs majoritaires

	IC ₉₀ (µM)
Monométhyléther de pinosylvine <u>1</u>	28 ± 2
Pinocembrine <u>2</u>	38 ± 4
Dihydromonométhyl éther de pinosylvine <u>7</u>	60 ± 3
Chrysine <u>8</u>	> 200
Diméthyléther de pinosylvine <u>15</u>	> 200
Pinostrobin <u>16</u>	> 200
Amphotéricine B	1,2 ± 0,2

L'activité anti-inflammatoire des composés a été évaluée sur les cellules murines RAW 264.7 stimulées avec le LPS (Tableau 10). Parmi les six composés testés, seulement le monométhyléther de pinosylvine 1 possédait des propriétés anti-inflammatoires au test sur RAW 264.7, avec une IC₅₀ de 53 ± 2 µM et 57% d'inhibition de l'oxyde nitrique à la concentration maximale non toxique (80 µM). Tous les autres composés sont inactifs avec des valeurs d'IC₅₀ qui étaient supérieures à 80 µM.

Tableau 10 : Activité anti-inflammatoire sur RAW 264.7 des composés purs majoritaires

	IC ₅₀ anti-inflammatoire (µM)	% inhibition NO à concentration maximale non toxique
Monométhyléther de pinosylvine <u>1</u>	53 ± 2	57 % à 80 µM
Pinocembrine <u>2</u>	> 80	10 % à 80 µM
Dihydromonométhyl éther de pinosylvine <u>7</u>	> 80	12 % à 80 µM
Chrysine <u>8</u>	> 80	8 % à 80 µM
Diméthyléther de pinosylvine <u>15</u>	> 80	20 % à 80 µM
Pinostrobin <u>16</u>	> 80	34 % à 80 µM
L-name	1 mM	79 % ± 2 µM

Finalement, l'activité cytotoxique a été testée sur deux lignées de cellules cancéreuses, soit A-549 et DLD-1, ainsi que sur une lignée de cellule saine, WS-1 (Tableau 11). Deux des composés testés ont montré des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 200 µM, soit le monométhyléther de pinosylvine **1** avec des IC₅₀ variant entre 104 et 140 µM et la chrysine **8** avec des IC₅₀ variant entre 111 et 180 µM. Dans les deux cas, la cytotoxicité est faible et ne présente aucune sélectivité envers les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Le potentiel anticancéreux des composés testés n'est donc pas significatif et ne présente pas d'intérêt pour la suite. En revanche, il est pertinent de mentionner le fait que, pour le monométhyléther de pinosylvine **1** par exemple, la concentration cytotoxique pour les cellules saines est supérieure à celle nécessaire pour exercer l'activité antifongique, ce qui rend cette dernière d'autant plus intéressante.

Tableau 11 : Activité cytotoxique des composés purs majoritaires

	IC ₅₀ , A-549 (µM)	IC ₅₀ , DLD-1 (µM)	IC ₅₀ , WS- 1 (µM)
Monométhyléther de pinosylvine 1	140 ± 4	104 ± 8	192 ± 9
Pinocembrine 2	> 200	> 200	> 200
Dihydromonométhyl éther de pinosylvine 7	> 200	> 200	> 200
Chrysine 8	111 ± 8	180 ± 9	128 ± 8
Diméthyléther de pinosylvine 15	> 200	> 200	> 200
Pinostrobin 16	> 200	> 200	> 200
Etoposide	3 ± 1	5 ± 2	> 50

À l'issue de tous ces résultats, les composés démontrant le plus de potentiel pour le développement de produits à haute valeur ajoutée sont le monométhyléther de pinosylvine **1** ainsi que la pinocembrine **2**. En effet, ces deux composés démontrent la meilleure activité biologique, tout en étant isolés en bonne quantité avec peu d'étapes de fractionnement. La prochaine étape était donc de quantifier ces derniers dans l'extrait brut, afin d'avoir un portrait plus juste des possibilités d'avancement de ce projet de recherche.

Tableau 12 : Résumé des activités biologiques du monométhyléther de pinosylvine **1** et de la pinocembrine **2**, converties en µg/mL en comparaison avec leur fraction d'origine

	Antioxydant ORAC (µmol TE/mg)	Antifongique IC ₉₀ sur <i>Candida</i> <i>albicans</i> (µg/mL)	Anti- inflammatoire IC ₅₀ sur RAW 264.7 (µg/mL)	Cytotoxique IC ₅₀ sur WS-1 (µg/mL)
Fraction D	13 ± 3	26,8 ± 0,8	41 ± 5	74 ± 6
Monométhyléther de pinosylvine 1	18 ± 1	6,3 ± 0,5	12,0 ± 0,5	43 ± 2
Pinocembrine 2	17,3 ± 0,1	10 ± 1	NA	>200µM

2.3 Dosage des composés d'intérêt sur HPLC

Une méthode de dosage du monométhyléther de pinosylvine **1** et la pinocembrine **2** a été développée. Pour atteindre cet objectif, l'extrait éthanolique, la fraction D ainsi que le monométhyléther de pinosylvine **1** et la pinocembrine **2** ont été injectés sur HPLC-DAD (Figure 31). Puisque ce sont tous deux des composés qui absorbent fortement en UV, ils sont facilement observables par cette méthode de détection. Étant donné que l'intensité du signal fournit par le détecteur UV à barrette de diodes est proportionnel à la concentration des composés à l'étude, il est possible de réaliser une courbe d'étalonnage de l'aire sous la courbe selon la concentration pour chacun d'entre eux.

Avant de réaliser cette courbe, l'extrait éthanolique et la fraction D ont été injectés à une concentration de 10 mg/mL afin d'évaluer l'intervalle d'intensité approximatif que devront couvrir les solutions étalons. L'injection individuelle du monométhyléther de pinosylvine **1** et de la pinocembrine **2** (concentration de 1mg/mL, soit 1000 ppm) a permis de trouver les temps de rétention respectifs de 23,69 minutes et de 21,17 minutes. Selon la comparaison entre les intensités obtenues pour les composés purs à 1000 ppm, versus l'extrait éthanolique et la fraction D à 10 mg/mL, il a été convenu que la courbe étalon du monométhyléther de pinosylvine **1** sera réalisée avec un intervalle de concentration entre 100 à 1400 ppm, que celle

de la pinocembrine **2** serait plutôt comprise entre 50 et 800 ppm, et que la fraction D devrait être diluée à 5 mg/mL.

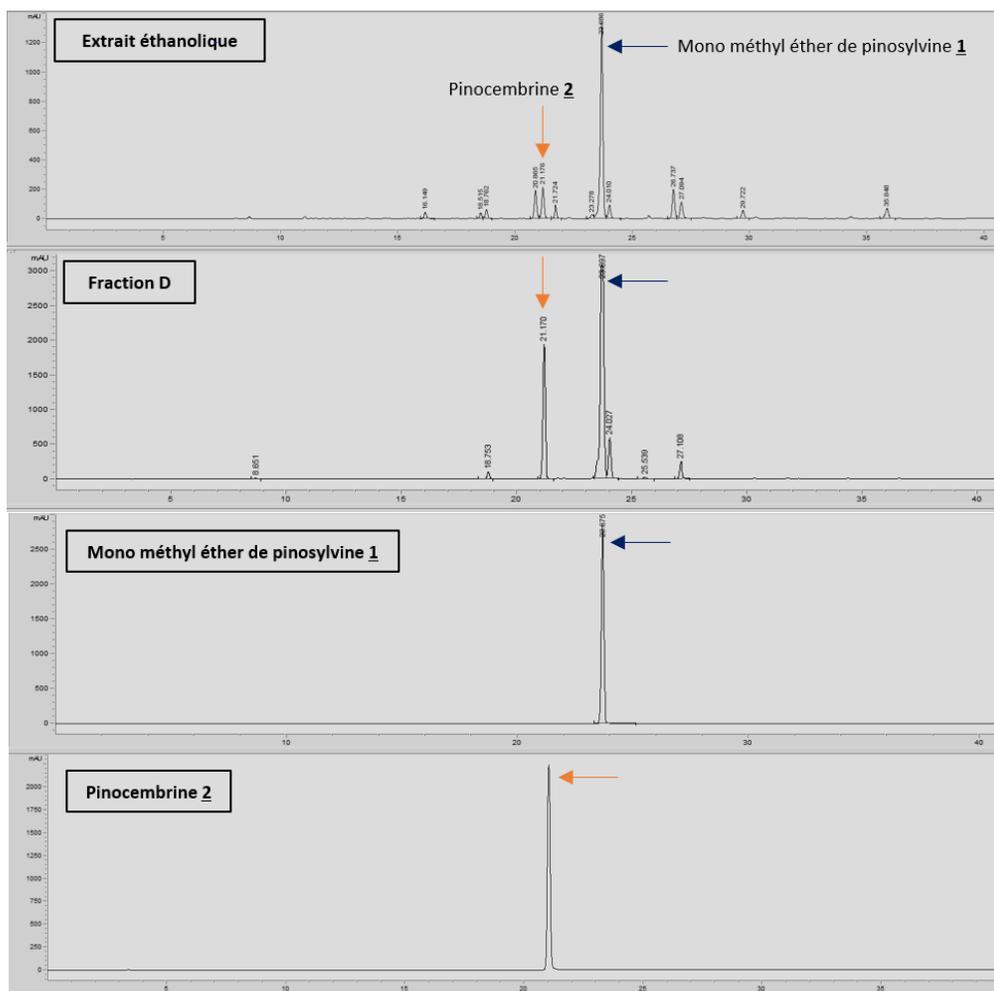


Figure 31 : Chromatogrammes HPLC-DAD 280 nm de l'extrait éthanologique (10 mg/mL), de la fraction D (5 mg/mL), du monométhyléther de pinosylvine **1** (1000 ppm) et de la pinocembrine **2** (1000 ppm) (voir les conditions dans la section *Matériel et méthodes*)

Les chromatogrammes présentés à la Figure 31 ont été obtenus avec une méthode HPLC assez large afin de pouvoir comparer les résultats sur différentes matrices végétales. En effet, des extraits éthanologiques d'aiguilles et d'écorces de pin blanc ont été préparés de la même façon que l'extrait de bois afin d'évaluer si les composés d'intérêt se retrouvent aussi dans ces parties de l'arbre. À la suite de l'injection de ces deux extraits, les résultats montrent l'absence de monométhyléther de pinosylvine **1** et de pinocembrine **2** dans l'écorce et dans

les aiguilles de pin blanc. Ces deux extraits montrent néanmoins plusieurs composés polaires (entre 0 et 15 minutes sur les chromatogrammes) qui ne figurent pas dans l'extrait éthanolique de bois de pin blanc, suggérant ainsi qu'il est plus judicieux de conserver ces conditions HPLC dans l'éventualité où l'on voudrait doser d'autres composés plus polaires et comparer leur présence dans diverses parties et/ou diverses espèces de pin.

2.3.1 Courbes d'étalonnage

Chaque courbe étalon a été obtenue avec l'analyse de cinq concentrations différentes, toutes les cinq étant produites en triplicata afin d'évaluer la précision de la méthode. La moyenne des aires sous la courbe de chaque concentration a permis de réaliser les courbes présentées aux Figure 32 et 33. Pour le monométhyléther de pinosylvine 1, l'écart-type relatif des aires mesurées est de 2,4%, tandis que celui pour les valeurs de la pinocembrine 2 est de 2,7%. Un même échantillon a été injecté trois fois afin d'évaluer l'erreur instrumentale, et les trois valeurs obtenues étaient identiques, ce qui confirme que la réponse de l'appareil est fiable, et que l'erreur calculée sur les courbes d'étalonnages provient davantage de l'erreur de dilution. Les solutions dosées seront donc toutes préparées en triplicata afin d'avoir un meilleur niveau de confiance envers les prochains résultats.

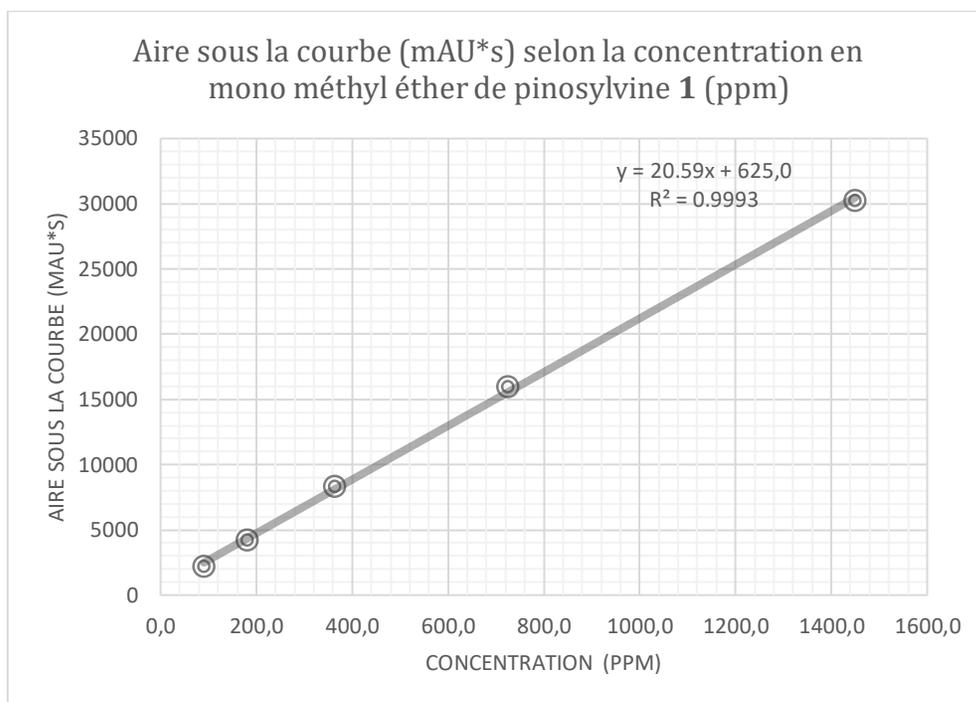


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de l'aire sous la courbe selon la concentration en monométhyléther de pinosylvine **1** dans l'échantillon injecté

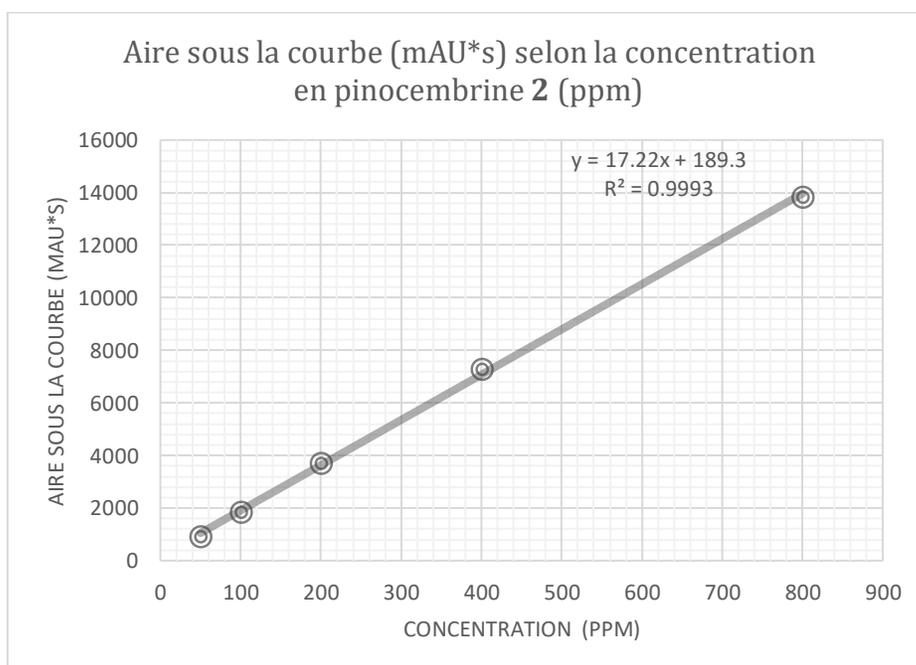


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'aire sous la courbe selon la concentration en pinocembrine **2** dans l'échantillon injecté

2.3.2 Teneur des composés dans l'extrait brut

Des solutions de l'extrait éthanolique (10 mg/mL) et de la fraction D (5 mg/mL) ont été préparées chacune en triplicata, puis injectées sur HPLC selon la même méthode que pour l'obtention des courbes étalons. Selon l'aire respective mesurée et les équations fournies par les droites du monométhyléther de pinosylvine 1 et de la pinocembrine 2, les concentrations de ces deux composés ont été calculées en ppm et en mg/g (Tableau 13). À l'issue des moyennes et des écarts-types obtenus, la concentration calculée du monométhyléther de pinosylvine 1 est de $43,0 \pm 0,5$ mg/g dans l'extrait éthanolique et de 255 ± 3 mg/g dans la fraction D, tandis que celle de la pinocembrine 2 est de $6,8 \pm 0,2$ mg/g et de 109 ± 3 mg/g respectivement pour ces deux échantillons.

Tableau 13 : Résultats du dosage du monométhyléther de pinosylvine 1 et de la pinocembrine 2 au sein de l'extrait éthanolique de bois de pin blanc et de la fraction enrichie D

Échantillon	Composé	Aire sous la courbe (mAU*s)	Concentration (ppm)	Concentration (mg/g)
Extrait éthanolique	<u>1</u>	9700 ± 900	430 ± 50	$43,0 \pm 0,5$
	<u>2</u>	1400 ± 100	68 ± 6	$6,8 \pm 0,2$
Fraction D	<u>1</u>	26000 ± 3000	1300 ± 100	255 ± 3
	<u>2</u>	14000 ± 1000	790 ± 70	109 ± 3

Les rapports de concentration entre ces deux composés coïncident bien avec ce que l'on observe à la Figure 31. Néanmoins, la fraction D semble concentrer toute la pinocembrine 2 de l'extrait éthanolique, mais pas tout le monométhyléther de pinosylvine 1 selon les proportions obtenues. Ceci s'explique en partie par le fait que la fraction C contient également ce stilbène selon la CCM de la Figure 8. La fraction C représentant approximativement le même pourcentage massique de l'extrait éthanolique que la fraction D, il est certain que la masse qui s'y trouve est significative.

Il est aussi important de préciser que les résultats obtenus sont valables seulement pour l'échantillon de bois de pin blanc analysé lors de ce projet de recherche. Avant d'émettre une conclusion sur la teneur de ces composés, il serait nécessaire de faire une étude statistique

de quantification au sein plusieurs individus de cette espèce. Puisque plusieurs paramètres peuvent changer la teneur disponible en métabolites secondaires, on ne peut se fier seulement aux résultats provenant d'un seul individu. Néanmoins, selon la teneur calculée et l'activité biologique testée, c'est le monométhyléther de pinosylvine 1 qui se démarque au niveau du potentiel de développement de produits à haute valeur ajoutée. Sa faible hydrosolubilité limite cependant son utilisation, ce qui représente certainement un défi pour son développement. L'une des solutions à envisager est la glycosylation du second groupement hydroxy de ce stilbène, ce qui augmenterait son hydrosolubilité. La dernière partie de ce projet de recherche porte donc sur un essai de glycosylation ainsi que la mise en avant de certaines perspectives pour la suite.

3.3 Travaux préliminaires de synthèse

La glycosylation, qui consiste à lier de façon covalente un sucre à la structure d'une autre molécule, permet souvent d'améliorer l'hydrosolubilité et d'autres propriétés pharmacologiques du composé parent⁸⁹. Ce type de réaction nécessite cependant, de façon plus conventionnelle, l'utilisation de groupements protecteurs, ce qui implique des étapes supplémentaires de synthèse. D'autres enjeux sur le plan opérationnel ainsi que sur le rendement du produit final rendent difficilement applicables à plus grande échelle certaines méthodes de glycosylation. Le défi est donc de développer des conditions simples et efficaces, qui ne nécessitent idéalement pas de groupements protecteurs ainsi que peu d'étapes de synthèse.

3.3.1 Glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1

La méthode décrite dans cette section est inspirée des conditions développées par Wadzinski *et al.*⁹⁰ pour une O-glycosylation régiosélective non-protégée de composés phénoliques en milieu aqueux. Pour ce faire, les fluorures de glycosyles (α) ont été choisis comme donneurs puisqu'ils présentent assez de stabilité pour faire face à une éventuelle hydrolyse aqueuse, tout en étant assez réactifs envers les nucléophiles anioniques pour permettre une glycosylation efficace pour une large gamme d'accepteurs de glycosyles en

présence de Ca^{2+} . Les cations calcium proviennent du triflate de calcium ($\text{Ca}(\text{OTf})_2$), ce dernier qui permet d'obtenir de meilleurs rendements que l'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)⁹⁰. Ces conditions devraient permettre d'obtenir le produit O- β -glycosyle de façon exclusive. Les auteurs supposent que la réaction procède selon un mécanisme de substitution nucléophile bimoléculaire ($\text{S}_{\text{N}}2$).

À l'issue de leurs résultats, un premier essai de glycosylation du monométhyléther de pinosylvine **1** a été réalisé avec six équivalents d' α -D-fluoro-glucopyranose et six équivalents de triflate de calcium, une heure sous agitation à température ambiante. Ce stilbène étant insoluble dans l'eau, la méthode Wadzinski *et al.*⁹⁰ a été modifiée en utilisant une concentration de 0,2 M dans un milieu aqueux à 45% de triméthylamine. Après une heure, le monométhyléther de pinosylvine **1** était complètement converti en un autre produit plus polaire, et ce dernier a été purifié sur cartouche SPE C₁₈ avec un mélange de 70% de méthanol dans l'eau. Dès le premier essai, le composé **17** a été isolé avec un rendement de 78% (Figure 34).

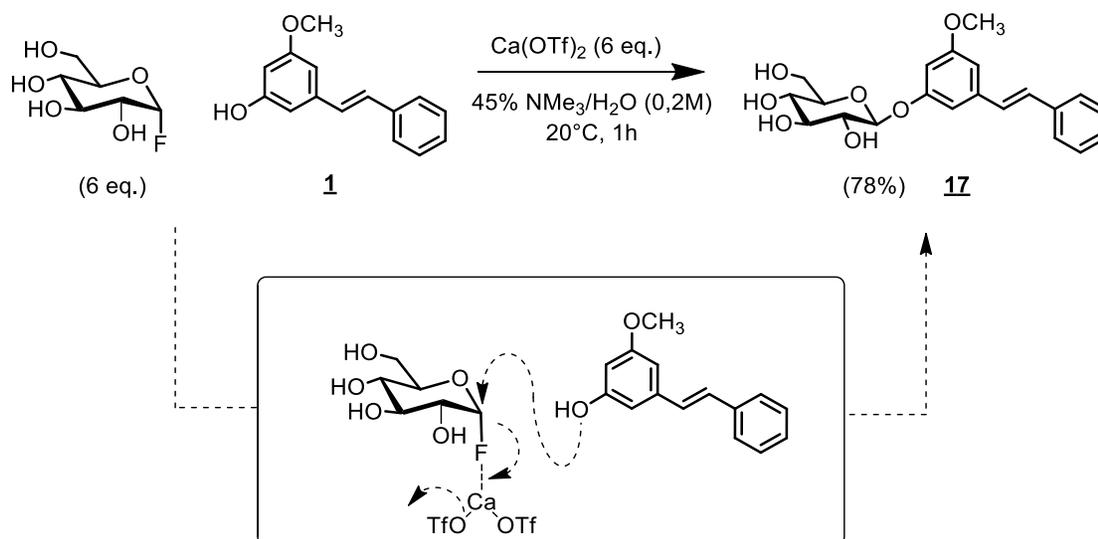


Figure 34 : Schéma réactionnel de la glycosylation du monométhyléther de pinosylvine **1** et mécanisme du possible état de transition

L'analyse des spectres RMN (présentés à l'Annexe 4), les résultats de spectrométrie de masse à haute résolution et la mesure de l'indice de rotation ont permis d'identifier le (-)-5-O- β -D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine **17** (Figure 35), ce dernier étant produit

avec un haut niveau de pureté. Sur RMN, s'ajoutent aux signaux caractéristiques du monométhyléther de pinosylvine **1** ceux du glucopyranose, dont l'hydrogène (doublet à 4,92 ppm) situé sur le carbone anomérique (102,6 ppm) corrèle fortement avec le carbone en position 5 (160,5 ppm) du stilbène en HMBC, confirmant ainsi la O-glycosylation. La constante de couplage de 7,3 Hz de cet hydrogène montre aussi qu'il s'agit du O- β -glycosyle, conformément aux travaux de Wadzinski *et al.*⁹⁰.

Seulement deux publications dans la littérature rapportent ce glucoside^{91,92}. Le seul qui explique les conditions pour obtenir ce composé est celui écrit par Bengt Lindberg en 1948⁹², avec une méthode qui emploie des étapes de protection, une durée de réaction plus longue et plusieurs étapes de purification laborieuses. La caractérisation structurale du composé se limitait seulement à l'analyse élémentaire CHNS. Ce travail permet de rapporter pour la première fois les données RMN et MS complètes de ce produit. La méthode de glycosylation mise de l'avant dans ce projet est plus simple à mettre en œuvre, sélective et potentiellement adaptable à plus grande échelle.

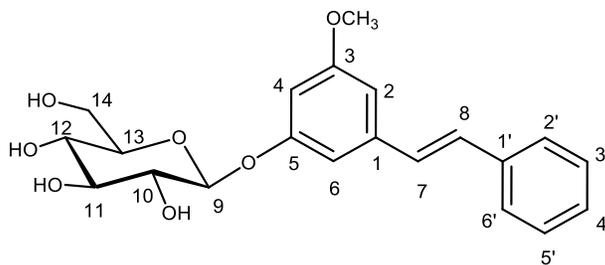


Figure 35 : Structure du (-)-5-O- β -D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine **17**

Poudre blanchâtre, ; $[\alpha]_D - 55,455^\circ$ (MeOH ; c 0,110 g/100mL ; 23°C), QTOF 433,14863 $[M+HCO_2]^-$ (calculé pour $C_{22}H_{25}O_9^-$, 433,15041), 775,29322 $[2M-H]^-$ (calculé pour $C_{42}H_{47}O_{14}^-$, 775,29713), 821,29872 $[2M+AF-H]^-$ (calculé pour $C_{43}H_{49}O_{16}^-$, 821,30261), Rf 0,24 (gel de silice 60 F₂₅₄ CH₂Cl₂/CH₃OH 10 :1), 0,47 (gel de silice 60 RP-18 F₂₅₄ H₂O/CH₃OH 3 :7).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃OD) δ 162,4 (C-3), 160,5 (C-5), 140,9 (C-1), 138,7 (1'), 130,4 (C-8), 129,7 (3',5'), 129,5 (C-7), 128,7 (C-4'), 127,6 (2',6'), 108,2 (C-6), 107,6 (C-2), 103,5 (C-

4), 102,6 (C-9), 78,4 (C-13), 78,1 (C-11), 75,1 (C-10), 71,6 (C-12), 62,7 (C-14), 55,9 (C-3-OCH₃).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,54 (d, J=7,8 Hz, 2H, H-2',6'), 7,34 (t, J=7,8 Hz, 2H, H=3',5'), 7,24 (t, J=7,3 Hz, 1H, H-4'), 7,16 (d, J=16,4 Hz, 1H, H-8), 7,09 (d, J=16,4 Hz, 1H, H-7), 6,96 (t, J=1,8 Hz, 1H, H-6), 6,79 (t, J=1,8 Hz, 1H, H-2), 6,62 (t, J=2,3 Hz, 1H, H-4), 4,92 (d, J=7,3 Hz, 1H, H-9), 3,94 (dd, J=2,2, 12,0 Hz, 1H, H-14), 3,81 (s, 3H, H-3-OCH₃), 3,70 (dd, J=6,3, 12,0 Hz, 1H, H-14), 3,49 (m, 3H, H-10,11,13), 3,38 (t, J=9,0 Hz, 1H, H-12).

3.3.2 Activité biologique du glycoside 17

Les résultats d'activité biologique *in vitro* présentés au Tableau 14 montrent que le 5-O-β-D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17 n'est pas actif comme l'était son aglycone. En effet, ces essais ont été réalisés parallèlement avec le monométhyléther de pinosylvine 1, confirmant ainsi que la glycosylation a entraîné une perte de l'activité biologique. Plusieurs articles rapportent que l'activité antifongique de stilbènes apparentés était jusqu'à six fois supérieure à celle des stilbènes glycosylés^{93, 94}. La même tendance est également observée pour l'activité anti-inflammatoire^{95, 96}. Dans les plantes, les stilbènes sont généralement stockés sous forme glycosylée dans la vacuole, et au besoin, ils sont libérés puis clivés par les β-glycosidases pour qu'ils puissent agir sous leur forme aglycone active¹¹.

Tableau 14 : Résumé des résultats d'activité biologique du 5-O-β-D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17

<u>Antioxydant</u> ORAC (μmol TE/ μmol)	<u>Antifongique</u> IC ₉₀ sur <i>Candida</i> <i>albicans</i> (μM)	<u>Anti-inflammatoire</u> % inhibition à concentration maximale non toxique (sur RAW 264.7) (μM)	<u>Cytotoxique</u> IC ₅₀ sur a-549, DLDD-1 et WS- 1 (μM)
0,4 ± 0,2	>200	14,9 % à 160	>200

Néanmoins, ces observations ont été confirmées pour le glucose, mais on ne peut conclure que les résultats seraient les mêmes en changeant le type de sucre. Il serait donc intéressant de se pencher sur une étude de relations structure/activité de différents glycosides

du monométhyléther de pinosylvine **1**, tout en portant une attention particulière sur l'efficacité de la méthode envers ces différents donneurs. L'augmentation de l'hydrosolubilité a été observée de façon qualitative, ce qui montre l'utilité de la glycosylation dans ce cas de figure, mais la détermination du LogP permettrait de quantifier cet aspect et d'ainsi apporter une valeur ajoutée aux résultats obtenus. Cette partie du projet de recherche permet donc d'orienter certaines perspectives futures tout en proposant une méthode de synthèse simple et efficace qui pourra être éventuellement utilisée dans d'autres circonstances.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Matériel général et instrumentation

3.1.1 Matériel général

Solvants

Les solvants utilisés étaient fournis par Fisher Chemical et certifiés selon différents grades dépendamment des utilisations : ACS pour une utilisation plus générale, Optima pour un usage analytique et LCMS lors de l'utilisation d'un spectromètre de masse. Les solvants utilisés pour la RMN, quant à eux, étaient fournis par Sigma-Aldrich et certifiés deutéré à 99,8%. L'eau utilisée était purifiée par un système Milli-Q (0,22 µm).

Chromatographie sur couche mince

Les plaques CCM étaient des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (phase normale) ou RP-18 (phase inverse) avec indicateur F₂₅₄ dans les deux cas, de marque Supelco fournies par Sigma-Aldrich. Les plaques de phase normale étaient éluées dans différents mélanges composés, selon le cas, de dichlorométhane, de chloroforme, de méthanol, d'hexanes ou d'acétate d'éthyle, tandis que celles en phases inverses étaient éluées dans différentes proportions de méthanol ou d'acétonitrile dans l'eau. Dans tous les cas, la phase mobile était préparée, puis laissée dans une cuve de verre jusqu'à sa saturation (30-40 min). Après l'éluion, les plaques étaient séchées à l'air, observées sous une lampe UV à 254 nm, révélées au H₂SO₄ 20% dans du méthanol, chauffées 5 min à 120 °C, puis réobservées dans la lumière visible.

Chromatographie éclair sur gel de silice

La chromatographie éclair sur gel de silice a été utilisée plusieurs fois dans ce projet de recherche pour du fractionnement, de l'isolation ou de la purification. Dans tous les cas, une

colonne de verre était fixée avec un statif, et une petite quantité de laine de verre y était ajouté au fond, qui était ensuite recouverte de sable pour la maintenir. Du gel de silice F60 (40-63 μm , 60 Å), préalablement pesé pour atteindre un pourcentage massique d'échantillon à séparer d'environ 1%, était mélangé avec l'éluant de départ, puis ajouté dans la colonne. L'échantillon, aussi dilué dans l'éluant de départ, était ensuite ajouté sur la silice, ou en cas de problème de solubilité, le dépôt se faisait sous la forme d'un « dry pack ». Une fois les fractions réunies (par concordance sur CCM), les solvants étaient évaporés par un évaporateur rotatif de marque Büchi.

3.1.2 Instrumentation

HPLC-DAD

La chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes, aussi appelée la HPLC analytique dans ce document, a été utilisée à plusieurs reprises pour l'évaluation de la pureté des composés, la prise de leur spectre UV, pour développer les conditions de la séparation sur la HPLC semi-préparative ou encore pour réaliser le dosage des composés d'intérêt. L'instrument était un Agilent 1100 (modules de dégazage et d'injection Agilent 1200), et les injections étaient réalisées sur une colonne C18 Luna Omega 5 μm (250 x 4,6 mm, 100 Å) de la marque Phenomenex. Les échantillons préalablement filtrés (filtres PTFE 25 mm 0,45 μm , Agilent) étaient injectés en quantité de 5 à 10 μL selon la méthode utilisée, avec un débit de 0,8 à 1 mL/min d'un certain gradient d'acétonitrile dans l'eau. Les longueurs d'ondes choisies étaient 210 nm, 254 nm et 280 nm.

HPLC semi-préparative

Après le développement des conditions de fractionnement par la HPLC analytique, certains composés ont été obtenus par l'entremise de la HPLC semi-préparative (Shimadzu, dégazeur DGU-20A, pompes LC-20AP, échantillonneur SIL-10AP, détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A et collecteur de fraction automatique FRC-10A). L'échantillon était injecté sur une colonne C18 Luna Omega 5 μm (250 x 21,2 mm, 100 Å) de la marque Phenomenex,

avec un débit de 20 mL/min. Le volume d'injection dépendait de l'efficacité de la séparation, de la quantité d'échantillon disponible et du volume nécessaire à le solubiliser. Une fois la méthode terminée et les fractions réunies, les solvants étaient évaporés par un évaporateur rotatif, et l'eau restante par un lyophilisateur de la marque Labconco.

LCMS et Q-TOF

Le spectre de masse des composés purs a été obtenu par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Agilent 1260 Infinity II, LC/MSD Series Infinity lab, ionisation par électrospray). La colonne utilisée était la même que pour la HPLC analytique, mais la méthode était beaucoup plus rapide (20% à 100% d'acétonitrile dans l'eau, en 15 minutes) puisqu'il n'y avait aucune séparation à faire (colonne utilisée seulement pour concentrer l'injection sur le détecteur). L'échantillon était également filtré à 0,45 µm, et la quantité injectée était de 4 µL. L'ionisation était en mode négatif pour les composés phénoliques, et en mode positif pour les autres.

Le 5-O-β-D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine **17** a été le seul à être analysé sur Q-TOF, sur un LC 1260 Infinity II 6546 LC/Q-TOF, d'Agilent. La colonne et la méthode LC sont les mêmes que pour le LCMS, mis à part que les solvants contenaient 0,1% d'acide formique. Les paramètres suivants ont été programmés lors de la création de la méthode : température du gaz à 120 °C, scan en mode négatif, paramètres de la source : VCap de 2300, 1000 volts et fragmentation de 175.

RMN

La résonance magnétique nucléaire a permis de caractériser la structure des composés isolés. Pour ce faire, les spectres 1D (¹H, ¹³C, DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) ont été acquis sur un spectromètre Bruker Ascend 500 MHz. Les spectres ¹H ont été enregistrés à 500 MHz, et les spectres ¹³C ont été enregistrés à 126 MHz. Le choix du solvant, le nombre de scans et la largeur des fenêtres spectrales diffèrent selon le composé et la quantité disponible.

Polarimètre

L'indice de rotation des composés possédant un carbone asymétrique au sein de leur structure a été mesuré par un polarimètre automatique Autopol IV de la marque Rudolph Research Analytical. La cellule utilisée avait une longueur de 100 mm, et les échantillons étaient solubilisés dans du méthanol Optima.

3.2 Travaux d'extraction et de fractionnement

3.2.1 Extraction

Le matériel végétal a été récolté au Saguenay-Lac-St-Jean au printemps 2021, puis broyé avec un broyeur « Universal cutting mill pulverisette19 », avec la cassette à tamis carré de 4 mm, fournis par Fritsch. Le matériel a été séché à l'air libre pendant une semaine, avant d'être entreposé au congélateur.

Plusieurs essais d'extraction ont été réalisés afin d'optimiser la méthode. À l'issue des différents tests au bain à ultrasons et par macération, selon différents paramètres (ratio solide/liquide, durée, température, répétition), les conditions suivantes ont été déterminées : un ratio massique de 1 pour 7 de copeaux broyés et de solvant, 40 minutes dans un bain à ultrasons (Fisher Scientific FS220D) à 20°C, suivis d'une filtration sur Büchner (filtre Whatman grade 3). Cette méthode est réalisée de façon séquentielle à l'hexane, suivie de deux autres fois à l'éthanol 95%. Une fois les extraits réunis, ces derniers sont refiltrés sur Büchner, puis évaporés à sec sur l'évaporateur rotatif (40°C).

En tout, 1,7 kg de copeaux broyés secs ont permis d'obtenir 49,5 g d'extrait hexanique et 43,8 g d'extrait éthanolique. L'extrait hexanique a été entreposé au congélateur n'étant pas utilisé dans le cadre de ce projet.

3.2.2 Fractionnement et isolation de composés purs

Fractionnement de l'extrait éthanolique

Le premier fractionnement de l'extrait éthanolique a été réalisé par chromatographie éclair sur gel de silice avec un ratio massique extrait/silice d'environ 1 pour 70. L'extrait a été séparé en quatre portions de 10 g en raison de la limitation de grosseur des colonnes

accessibles (le 3,8 g restant a été mis de côté pour les tests d'activité biologique, le dosage et les CCM qui ont été réalisées tout au long du projet). Il est possible de faire la séparation avec un gradient de dichlorométhane/méthanol, ou encore d'hexanes/acétate d'éthyle, au choix, comme montre la Figure 36.

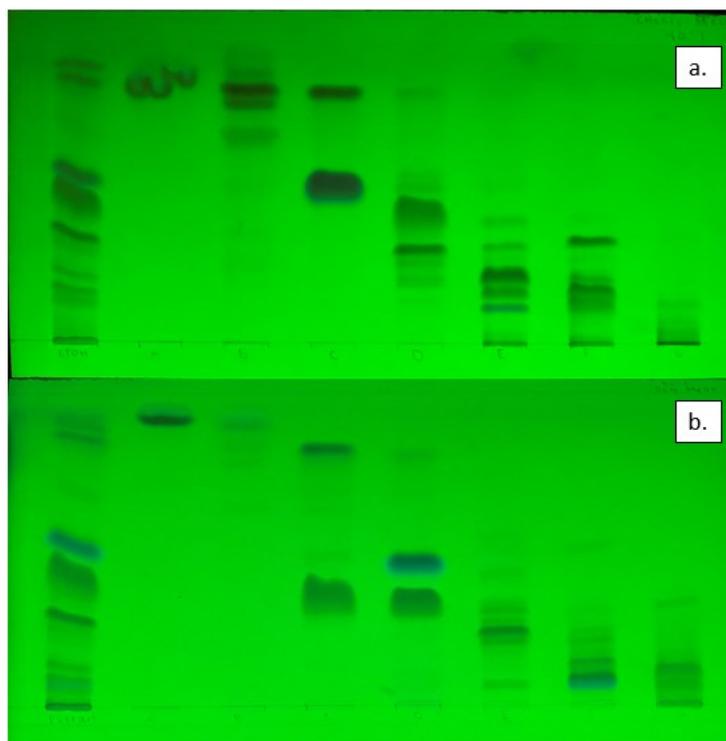


Figure 36 : Analyse CCM du fractionnement de l'extrait éthanolique sur colonne de gel de silice : a. séparation avec dichlorométhane/méthanol, b. séparation avec hexanes/acétate d'éthyle (milieu d'élution des plaques : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm)

La séparation montrée à la Figure 36.a a été réalisée sur 11,05 g d'extrait éthanolique avec 715 g de gel de silice (volume mort de 1,5 L), et a nécessité 2,5 L de chacun des mélanges dichlorométhane/méthanol suivants : 100 :0, 70 :1, 40 :1, et 20 :1, suivis d'un lavage au méthanol, pour un total de 11 L de solvants organiques. Le rendement massique des fractions recueillies était de 96,1 %. La séparation ayant mené à la CCM de la Figure 36.b a été réalisée sur 9,14 g d'extrait éthanolique pour 660 g de gel de silice (volume mort de 1,2 L). 14 L de solvants organiques ont été nécessaires à la séparation, soit 3 L des mélanges d'hexanes/acétate d'éthyle 20 :1, 10 :1, 5 :1 et 6 :4, suivis d'un lavage au méthanol (l'acétate

d'éthyle n'est pas assez polaire pour tout retirer de la colonne). Le rendement massique était cette fois de 93,2 %. Après une colonne au dichlorométhane/méthanol et trois à l'hexanes/acétate, les fractions semblables ont été réunies pour obtenir celles présentées dans la section résultats à la Figure 8 (fractions A à G), avec un rendement massique global de 94,8 %.

Fractionnement de la fraction D et isolation des composés 1 à 7

La fraction D (3,1 g) a été séparée sur 300 g de gel de silice avec un gradient isocratique de chloroforme/méthanol 90 :1 (1L) pour obtenir le composé 1 avec un rendement massique de 18 % (560 mg). La fraction plus polaire restante (D2 sur la Figure 37) a ensuite été injectée sur HPLC semi-préparative selon les conditions suivantes : injection de 200 µL (concentré à 400 mg/mL dans l'acétonitrile), débit de 20 mL/min, gradient de 15% à 100% d'acétonitrile dans l'eau en 40 min suivi de 5 min de rinçage à l'acétonitrile et collecte de fractions de 14,5 mL (ensuite rassemblées selon le chromatogramme obtenu et les résultats des CCM). Seulement quatre injections ont été réalisées afin d'avoir une masse suffisante pour l'isolation de composés, mais en limitant le gaspillage de solvants organiques. Alors, sur 320 mg injectés au total, 274,9 mg ont été recueillis après la séparation.

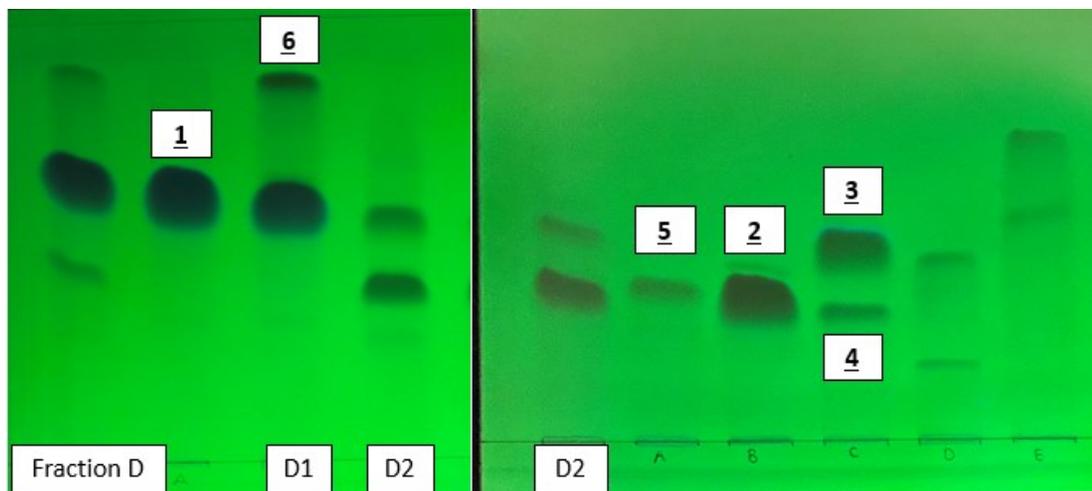


Figure 37 : Résumé sur CCM du fractionnement de la fraction D (gauche) sur colonne de gel de silice et de celui de la fraction D2 (droite) sur HPLC semi-préparative (milieu d'élution des plaques : dichlorométhane/méthanol 40 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm)

À la suite de cette séparation sur HPLC semi-préparative, certaines méthodes de purification ont été nécessaires afin d'obtenir les composés purs. Le composé 2 (129 mg) a été purifié de son impureté apolaire par sa précipitation dans un milieu à 60% de méthanol dans l'eau (l'impureté était soluble dans ce milieu, mais pas le composé 2). Ensuite, le composé 3 a été séparé du composé 4 sur gel de silice (75 mg du mélange sur 8 g de silice) avec 100 mL de chloroforme pour l'obtention des composés purs avec des masses respectives de 42 mg et de 25 mg. Le composé 5 (28 mg) a également été purifié sur gel de silice (ratio 1 pour 100) par du chloroforme (50 mL) en raison de la présence d'une impureté plus polaire.

Enfin, la séparation de D1 sur gel de silice, aussi au chloroforme et selon un ratio de 1 pour 100, a permis d'obtenir 15 mg du composé 6. Comme mentionné plus haut, ce composé semble beaucoup présent dans la fraction C, alors qu'il n'est que sous forme de traces dans la fraction D. Après cette colonne, la CCM a montré un composé avec le même facteur de rétention que le composé 1, mais avec une allure différente sous UV (tache beaucoup moins intense et moins bleutée). Une HPLC semi-préparative a donc été réalisée dans les conditions suivantes : injection de 200 µL à 227 mg/mL dans l'acétonitrile, débit de 20 mL/min, gradient de 15% à 100% d'acétonitrile dans l'eau en 30 min, suivi d'un lavage de 5 min à l'acétonitrile, récolte de fractions de 8 mL. Cette séparation a permis l'obtention de 60 mg du composé 7.

Fractionnement de la fraction E et isolation des composés 8 à 14

La fraction E (1,8 g) a été refractionnée sur 200 g de gel de silice (volume mort de 400 mL) avec 1 L de chacun des mélanges de chloroforme/méthanol suivants : 100 :0, 70 :1 et 40 :1 (suivi d'un lavage au méthanol). Les composés présents dans la fraction ont une polarité semblable et sont difficiles à séparer sur phase normale. En revanche, cette colonne a permis de séparer grossièrement la fraction E en deux fractions (fractions E1 et E2 sur la Figure 38). La fraction E2 a été solubilisée dans du dichlorométhane et un précipité jaune s'est formé. Ce solide était le composé 8 avec un haut niveau de pureté (101 mg). Le surnageant a été repurifié sur colonne de gel de silice avec un éluant constitué d'hexanes et d'acétate d'éthyle (9 :1), ce qui a mené à l'isolation de 58 mg du composé 9.

Les fractions restantes (E2) ont été réunies, puis injectées sur la HPLC semi-préparative selon les conditions suivantes : injection de 200 μ L à 100 mg/mL dans l'acétonitrile, débit de 20 mL/min, gradient de 40% à 100% d'acétonitrile dans l'eau en 45 min, suivi d'un lavage de 5 min à l'acétonitrile, récolte de fractions de 6 mL. Cette séparation a permis d'isoler directement les composés **10** (14 mg), **11** (25 mg), **12** (17 mg), **13** (12 mg) et **14** (21 mg). Les faibles quantités récoltées ont été causés par la présence d'une fuite dans le système de chromatographie liquide. Les composés **13** et **14** sont les seuls composés isolés de ce projet à ne pas absorber dans l'UV (d'où la superposition de la plaque après révélation au H₂SO₄ 20% à la Figure 38).

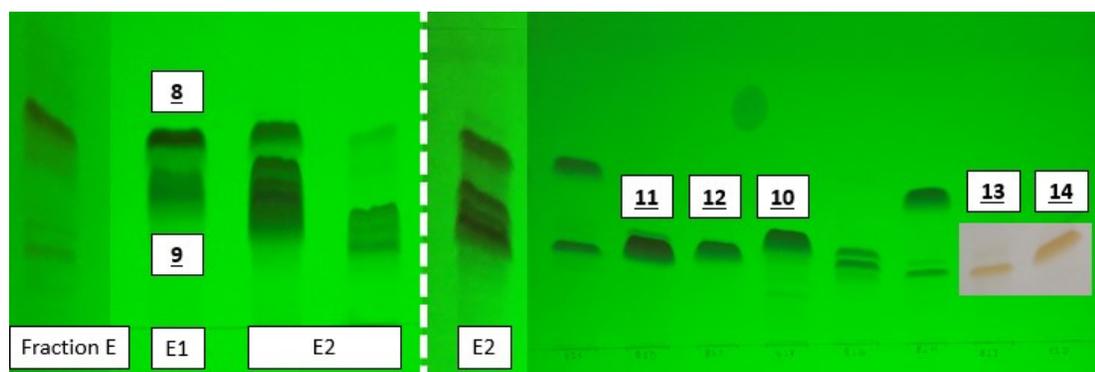


Figure 38 : Résumé sur CCM du fractionnement de la fraction E (gauche) sur colonne de gel de silice et de celui de la fraction E2 (droite) sur HPLC semi-préparative (milieu d'élution des plaques : chloroforme/méthanol 15 : 1, sans révélateur, lampe UV 254 nm (sauf pour **13** et **14**, superposition des taches après révélation au H₂SO₄ 20% dans méthanol)

*Fractionnement de la fraction A et isolation des composés **15** et **16***

La fraction A (5,1 g) a également été séparée sur colonne de gel de silice (300 g), mais cette fois avec un éluant isocratique (600 mL) 20 :1 d'hexanes et d'acétate d'éthyle. Seulement ce fractionnement a été nécessaire à l'isolation des composés purs **15** (80 mg) et **16** (197 mg). Le reste de la fraction A semble surtout composé d'acides gras ou d'autres composés apolaires qui n'absorbent pas la lumière UV.

3.3 Autres méthodes

Dosage des phénoliques

La teneur en composés phénoliques dans les extraits et les fractions a été calculée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu⁹⁷. Un volume de 50 µL de solution de concentration croissante d'analyte (0,39 à 50 mg/mL dans l'éthanol) est, à chaque fois, mélangé à 25 µL de réactif Folin-Ciocalteu dilué dans l'eau (1 : 2 v/v) dans des plaques de 96 puits (NUNC). Après 5 minutes, 125 µL d'une solution de carbonate de sodium décahydraté (20 g/100 mL) est ajouté, puis l'absorbance à 758 nm est mesurée par un lecteur de plaque automatique (Varioskan Ascent). L'absorbance d'un blanc (éthanol sans analyte) est soustraite à l'ensemble des valeurs, et les résultats finaux sont exprimés en équivalent d'acide gallique selon la courbe de calibration réalisée en parallèle de ce composé de référence. Chaque test est réalisé en triplicata sur une même plaque, et les échantillons y ont été soumis à deux reprises, à deux mois d'intervalle.

3.3.1 Activités biologiques *in vitro*

Un criblage de l'activité biologique *in vitro* a permis de guider les étapes de fractionnement tout au long de ce projet de maîtrise. L'extrait brut, les fractions et les composés purs ont été soumis à différents tests, tout en comparant ces derniers à leur fraction de provenance et en faisant plusieurs réplicatas afin de s'assurer de la fiabilité des résultats fournis. Les mesures de fluorescences nécessaires à ces tests ont toutes été réalisées sur un lecteur de plaque automatique (Fluoroskan Ascent FL). Ici, le terme analyte sera employé pour tout échantillon soumis aux tests biologique (extrait, fraction ou composé pur).

Activité antifongique

L'activité antifongique a été déterminée à l'aide de la méthode par microdilution développée par Banfi et al⁹⁸. Une densité de 2×10^3 de levures *C. albicans* dans 100 µL de milieu nutritif (gélose de Sabouraud dextrose, Difco) a étéensemencée dans les plaques de 96 puits. L'analyte est ensuite solubilisé dans du DMSO (Biotech) selon des concentrations croissantes, puis dilué dans du milieu nutritif avant d'être ajouté (100 µL) dans chaque puit.

Finalement, 50 μ L d'une solution à 4% de résazurine est ajouté, puis les plaques sont incubées 6 heures à 37 °C. Certains puits contiennent également que du milieu de culture et du DMSO, afin de s'assurer que la concentration de DMSO utilisée ne soit pas toxique (environ 0,1% v/v). L'absorbance est finalement mesurée à 540 nm, et les résultats sont exprimés en IC₉₀, soit la concentration minimale de l'analyte testé qui inhibe au moins 90% de la croissance de la levure, par rapport aux blancs (sans analyte) qui sont considérés comme ayant une survie maximale (100%). L'activité antifongique est comparée à un témoin positif, l'amphotéricine B.

Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par un test chimique ainsi que par un test cellulaire. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), soit le test chimique, permet de déterminer la capacité d'un échantillon à neutraliser les radicaux peroxydes (ROO^-) sur une sonde fluorescente (fluorescéine). La méthode utilisée est celle décrite par Ou et al⁹⁹, qui se fonde sur le principe que la fluorescéine n'est plus fluorescente une fois oxydée, donc que la fluorescence mesurée est directement proportionnel avec l'activité antioxydante de l'échantillon en contact avec la sonde. Pour ce faire, un gradient de 16 concentrations de l'analyte ont été préparées dans des plaques de 384 puits, en parallèle à différentes concentrations de Trolox, le contrôle positif, et à un blanc. Le test était réalisé à 37,5 °C dans un tampon phosphate à pH constant de 7,4. Le fluorimètre a ensuite été programmé pour enregistrer les mesures de fluorescence (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 nm et de 538 nm, respectivement) à toutes les minutes pendant une heure. Après l'ajout de 375 mM d'un oxydant, le 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), l'enregistrement des mesures débute. Les résultats finaux ont été calculés en utilisant l'aire sous la courbe des concentrations d'analyte pour lesquelles une diminution d'au moins 95% de la fluorescence a été observée, en comparaison au blanc et au témoin. Les valeurs fournies sont exprimées en micromoles d'équivalents Trolox (TE) par milligramme d'analyte ($\mu\text{mol TE/mg}$) (ou par micromoles ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$), pour les composés purs).

L'évaluation de l'activité antioxydante cellulaire a été effectuée selon la méthode décrite par Girard-Lalancette *et al.*¹⁰⁰, avec quelques modifications. Des plaques de 96 puits, dont chaque puit étaitensemencé par 10 000 cellules de fibroblastes (WS-1), ont été incubées pendant 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Après l'incubation, les cellules ont été lavées avec une solution saline (Hank's balanced salt solution, HBSS) à pH 7,4, puis réincubées 60 minutes avec 100 µL de HBSS contenant 5 µM de 2',7'-dichlorofluorescéinn-diacétate (DCFH-DA), ce dernier permettant la détection de l'oxydation intracellulaire. Les cellules ont ensuite été relavées au HBSS, puis réincubées pendant 2 heures avec une concentration croissante d'analyte et 100 µL de tert-butylhydroperoxide (tBH). La fluorescence a été mesurée après l'ajout de tBH, et 2 heures plus tard, avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives de 485 nm et de 538 nm. Le résultat final est exprimé en IC₅₀, soit la concentration d'analyte qui permet d'inhiber 50% de l'oxydation cellulaire (DCFH-DA), par rapport au témoin non traité (oxydation maximale), après soustraction du blanc. Dans les deux méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante, les résultats sont comparés à la réponse de la quercétine, un témoin positif.

Activité anti-inflammatoire

Pour ce qui est de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, la méthode est basée sur celle décrite par Green *et al.*¹⁰¹, soit par la mesure de l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) en réponse au phénomène inflammatoire, par des macrophages de souris (RAW 264.7). Ces macrophages ont été étalés dans des plaques de 96 puits à une densité de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits, dans 100 µL de milieu de culture (DMEM). Après une nuit d'incubation à 37°C avec 5% de CO₂, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes d'analyte (dissous dans du DMSO), stimulées avec 100 µg/mL de lipopolysaccharide (LPS), puis réincubées selon les mêmes conditions 24 h. Parallèlement aux analytes, certains puits contenaient du N-nitro-L-arginine méthyl ester hydrochloride (L-NAME) à titre de contrôle positif. Après les 24h, les surnageants ont été collectés, puis mis en contact avec le réactif de Griess afin de doser la concentration en NO, cette dernière étant inversement proportionnel à

l'efficacité de l'agent anti-inflammatoire testé. Pour ce faire, 100 μ L de surnageant, 50 μ L de sulfamide à 1% et 50 μ L de dichlorhydrate de N-1-naphtyléthylènediamine à 0,1% dans du H_3PO_4 à 2,5% ont été incubés, à température ambiante pendant 20 min. Enfin, l'absorbance à 550 nm était mesurée par le lecteur de plaque, et les résultats obtenus étaient exprimés en IC_{50} représentant la concentration d'analyte (ou de témoin) permettant d'inhiber 50% de la production de NO, à l'aide de la comparaison avec le blanc ainsi qu'avec une courbe étalon standard de $NaNO_2$.

Activité cytotoxique

Finalement, l'activité cytotoxique des fractions et composés envers des cellules cancéreuses de poumon (A-549) et de côlon (DLD-1), ainsi qu'envers les fibroblastes sains du derme (WS-1), a été testée. Pour chacune de ces lignées cellulaires, ces dernières étaient étalées dans des plaques de 96 puits, à une densité de 5×10^3 cellules par puit dans 100 μ L de milieu de culture, puis laissées telles quelles pendant 16h avant le traitement, afin d'assurer leur adhésion. Ensuite, des solutions d'un gradient croissant de concentration d'analyte dans du DMSO (Biotech) ont été diluées dans du DMEM, puis ajoutées selon un volume de 100 μ L dans les puits. La concentration en DMSO était toujours inférieure à 5% (v/v) afin qu'elle ne soit pas toxique envers les différentes lignées cellulaires. Les plaques ont été incubées 48h, et la cytotoxicité a été ensuite évaluée à l'aide de la résazurine, tel que décrit par O'Brien et al¹⁰². La mesure de fluorescence a donc été prise par un lecteur de plaques (longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 530 nm et de 590 nm), cette dernière étant directement proportionnelle à l'activité métabolique, et donc inversement proportionnel à la cytotoxicité de l'analyte testé. Les résultats finaux étaient exprimés en IC_{50} , soit la concentration d'analyte inhibant 50% de la croissance cellulaire, en comparaison aux mesures de fluorescence dans les puits témoins, après soustraction des valeurs à blanc dans tous les cas.

3.3.2 Quantification sur HPLC-DAD

Les composés d'intérêt, soit le monométhyléther de pinosylvine 1 et la pinocembrine 2 ont été quantifiés au sein de la fraction enrichie (fraction D) et de l'extrait éthanolique de départ. Pour ce faire, les composés purs, la fraction et l'extrait ont été injectés sur la HPLC analytique selon les conditions suivantes : injection de 10 μ L, gradient de 20% à 100% d'acétonitrile dans l'eau en 40 min, suivi de 10 min de lavage à l'acétonitrile, avec un débit de 1 mL/min, sur colonne Luna décrite plus haut, avec une détection à 280 nm

La solution d'extrait éthanolique a été préparée de sorte à avoir une concentration de 10 mg/mL, et celle de la fraction D a été préparée deux fois moins concentrée (5 mg/mL). Chacune des solutions a été faite en triplicata pour l'évaluation de l'erreur de dilution. Pour la courbe standard du monométhyléther de pinosylvine 1, la première solution était préparée à 1400 ppm (1,4 mg/mL, ou 6,19 mM), puis 1 mL de cette solution était ajouté dans un vial HPLC, avec une micropipette de 1000 μ L (Fisherbrand, Elite). Des dilutions en chaîne (facteur 2) avec cette micropipette ont permis de réaliser les solutions de concentration de 700 ppm, 350 ppm, 175 ppm et 87,5 ppm. Pour ce faire, les quatre vials contenaient précisément 500 μ L d'acétonitrile, sur lesquels 500 μ L de la solution mère y était ajoutés dans le premier vial. Après agitation, 500 μ L de cette nouvelle solution était ajoutée dans le vial suivant, et ainsi de suite. Chaque concentration a été réalisée en triplicata pour l'évaluation de l'erreur sur la méthode. Pour la courbe de la pinocembrine 2, les mêmes manipulations ont été reproduites pour obtenir des concentrations de 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm et 50 ppm.

Après l'injection de ces 30 solutions (cinq concentrations par courbe, en triplicata), la moyenne des aires sous la courbe est calculée, et les courbes d'étalonnage de l'aire sous la courbe (mAU*s) selon la concentration injectée (ppm) sont tracées par Excel pour les deux composés en question. Selon l'équation de la droite respective de ces derniers, il était possible de déduire la concentration en ppm de la solution injectée. On peut ensuite ramener cette valeur en mg de composé par g d'extrait (ou de fraction enrichie) à l'aide des relations suivantes :

$$y_{(mAU*s)} = ax_{(ppm)} + b$$

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/mL}, \text{ donc } \frac{x_{(ppm)}}{1000} = x_{(mg/mL)}$$

$$\frac{x_{(mg/mL)}}{\text{dilution}_{(g/mL)}} = x_{(mg/g)}$$

Où la dilution est celle utilisée lors de la préparation de la solution d'extrait (ou de la fraction).

3.3.3 Glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1

L'essai de glycosylation du monométhyléther de pinosylvine 1 a été réalisé selon les conditions décrites par Wadzinski et al⁹⁰, à quelques exceptions près. Brièvement, 10,7 mg du monométhyléther de pinosylvine 1 (0,047 mmol) a été dilué dans 250 μ L d'une solution aqueuse de triméthylamine 45% (CAS 75-50-3, Sigma-Aldrich), de sorte à avoir une solution de concentration 0,2 mol/L. Lorsque le mélange a été homogène, 102 mg de Ca(OTf)₂ (CAS 55120-75-7, Sigma-Aldrich) et 51,5 mg de α -D-glucopyranosyl fluoride (CAS 2106-10-7, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés, soit six équivalents molaires de chaque réactif. La solution (fermée, mais sans azote) a été agitée avec un agitateur magnétique à 500 rpm pendant une heure, à température ambiante. Ensuite, encore sous agitation, la triméthylamine a été évaporée de la solution avec un faible débit d'air pendant 30 minutes.

La purification du produit a été réalisée sur cartouche SPE C₁₈ (1000 mg, 6 mL, Bakerbond, J.T.Baker) avec un éluant à 70% de méthanol dans l'eau. Après conditionnement de la cartouche SPE, les produits de la glycosylation ont été dilués dans l'éluant, puis déposés sur la colonne. 20 mL d'éluant ont été utilisés au total, en récupérant des fractions de 0,5 mL. Une CCM dans ce même milieu, révélée au CAM, a permis de rassembler les fractions pures. Après évaporation à l'évaporateur rotatif, 15,2 mg de produit ont été recueillis, pour un rendement molaire de 78 %, selon le nombre de moles de monométhyléther de pinosylvine 1 utilisées au départ.

CONCLUSION

En conclusion, ce projet de maîtrise a permis de mettre au point une approche de fractionnement qui a permis d'isoler et d'identifier plusieurs composés de l'extrait éthanolique de bois de pin blanc avec un suivi de l'activité biologique.

L'extrait éthanolique a été séparé en sept fractions distinctes, dont deux présentaient une activité antifongique, antioxydante et anti-inflammatoire intéressantes. Le fractionnement bioguidé a mené à l'identification de seize composés purs, soit le monométhyléther de pinosylvine **1**, la pinocembrine **2**, la 3-acétoxy-5,7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone **3**, la cryptostrobine **4**, la 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone **5**, la tectochrysin **6**, le monométhyléther de dihydro pinosylvine **7**, la chrysin **8**, la 3-acétate pinobanksine **9**, l'acide 7-oxo-dihydroabiétique **10**, l'acide 12-hydroxyabiétique **11**, l'acide 7-oxo-13-isopimara-8,15-diène-18-oïque **12**, le 1-monoglycéride d'acide pinoléique **13**, le 1-monoglycéride d'acide linoléique **14**, le diméthyléther de pinosylvine **15** et la pinostrobine **16**. Ces composés ont été principalement caractérisés par LC-MS et RMN (^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, HSQC, HMBC). Parmi tous les composés isolés, cinq n'ont jamais été rapportés dans le *Pinus strobus* (**3**, **5**, **9**, **10** et **11**). De plus, à notre connaissance, le composé **14** n'a jamais été identifié dans le genre *Pinus*, et le composé **13** n'a jamais été identifié dans la nature.

Parmi les molécules testées, c'est le monométhyléther de pinosylvine **1** ainsi que la pinocembrine **2** qui présentaient les meilleures activités biologiques. Respectivement, les résultats antioxydants ORAC étaient de $18 \pm 1 \mu\text{mol Te}/\mu\text{mol}$ et de $17,3 \pm 0,1 \mu\text{mol Te}/\mu\text{mol}$, tandis que l' IC_{90} mesurée contre *Candida albicans* (activité antifongique) étaient de $28 \pm 2 \mu\text{M}$ et de $38 \pm 4 \mu\text{M}$, pour une activité cytotoxique plutôt faible envers les cellules saines WS-1 avec un IC_{50} de $192 \pm 9 \mu\text{M}$ pour le composé **1** et une valeur surpassant les $200 \mu\text{M}$ pour le composé **2**. À ces résultats s'ajoute une activité anti-inflammatoire pour le monométhyléther de pinosylvine **1**, avec un IC_{50} de la production d'oxyde nitrique chez RAW 264.7 de $53 \pm 2 \mu\text{M}$.

La quantification de ces deux composés sur HPLC-DAD a permis de calculer leur concentration respective au sein de l'extrait éthanolique de départ, soit $43,0 \pm 0,5 \text{ mg/g}$ pour

le monométhyléther de pinosylvine 1 et $6,8 \pm 0,2$ mg/g pour la pinocembrine 2. Le monométhyléther de pinosylvine 1 étant le plus abondant et le plus actif des composés isolés, il devient également un bon candidat pour la standardisation de l'extrait. En revanche, ce dernier possède une faible hydrosolubilité impliquant de nombreux défis pour les futurs choix de voie de valorisation. L'une des solutions envisagées fut le développement d'une méthode simple, efficace et régiosélective de glycosylation de ce stilbène. Le premier essai a mené au 5-O- β -D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17 en une seule étape de synthèse, avec un rendement de 78% et un haut niveau de pureté. Le glycosyl formé n'a pas montré d'activité biologique pour les tests à l'essai dans ce projet. Il serait intéressant de poursuivre ce travail en utilisant différents types de sucre autre que le glucose.

Pour les travaux futurs, en plus de poursuivre les essais de glycosylation du composé d'intérêt, une évaluation plus large de l'activité biologique serait pertinente. Par exemple, il serait intéressant de tester l'activité antifongique sur d'autres souches. La poursuite de l'identification des composés présents dans les extractibles de bois de pin blanc serait également pertinente pour pallier le manque de connaissances sur cette espèce. De plus, compte tenu que la quantité des métabolites secondaires varie fortement selon une panoplie de paramètres (différences individuelle, environnement, âge de l'arbre, moment de la récolte, présence d'espèces nuisibles, etc.), il serait pertinent d'élargir la quantification des composés d'intérêt à plusieurs individus afin de disposer d'un échantillonnage plus représentatif. Cette étude pourrait aussi être étendue à d'autres composés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gouvernement du Québec, Ministère des Ressources naturelles et des Forêts,, Chiffres-clés du Québec forestier - édition 2023. 2022.
2. Gouvernement du Québec, Ministère des Ressources naturelles et des Forêts,, Ressources et industries forestières du Québec - Portrait statistique 2022. 27 ed.; 2023.
3. Ferreira-Santos, P.; Zanuso, E.; Genisheva, Z.; Rocha, C. M.; Teixeira, J. A., Green and sustainable valorization of bioactive phenolic compounds from pinus by-products. *Molecules* **2020**, *25* (12), 2931.
4. Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Dufour, D.; Pichette, A., Antioxidant potential of bark extracts from boreal forest conifers. *Antioxidants* **2013**, *2* (3), 77-89.
5. Grether-Beck, S.; Marini, A.; Jaenicke, T.; Krutmann, J., French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effects on human skin: Clinical and molecular evidence. *Skin Pharmacology and Physiology* **2016**, *29* (1), 13-17.
6. Ran, J.-H.; Shen, T.-T.; Wu, H.; Gong, X.; Wang, X.-Q., Phylogeny and evolutionary history of Pinaceae updated by transcriptomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2018**, *129*, 106-116.
7. Krutovsky, K. V.; Troggio, M.; Brown, G. R.; Jermstad, K. D.; Neale, D. B., Comparative mapping in the Pinaceae. *Genetics* **2004**, *168* (1), 447-461.
8. Martínez-Vilalta, J.; Sala, A.; Piñol, J., The hydraulic architecture of Pinaceae—a review. *Plant Ecology* **2004**, *171* (1), 3-13.
9. Farjon, A., *Pines: drawings and descriptions of the genus Pinus*. Brill: 2021; p 235.
10. Neis, F. A.; de Costa, F.; de Araujo Jr, A. T.; Fett, J. P.; Fett-Neto, A. G., Multiple industrial uses of non-wood pine products. *Industrial Crops and Products* **2019**, *130*, 248-258.
11. Metsämuuronen, S.; Sirén, H., Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews* **2019**, *18* (3), 623-664.
12. Bakrim, S.; Machate, H.; Benali, T.; Sahib, N.; Jaouadi, I.; Omari, N. E.; Aboulaghras, S.; Bangar, S. P.; Lorenzo, J. M.; Zengin, G., Natural sources and pharmacological properties of pinosylvin. *Plants* **2022**, *11* (12), 1541.
13. Costanza, K. K.; Whitney, T. D.; McIntire, C. D.; Livingston, W. H.; Gandhi, K. J., A synthesis of emerging health issues of eastern white pine (*Pinus strobus*) in eastern North America. *Forest Ecology and Management* **2018**, *423*, 3-17.
14. Wendel, G.; Smith, H. C., Eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Silvics of North America* **1990**, *1*, 476-488.
15. Marie-Victorin; Brouillet, L.; Rouleau, E.; Goulet, I.; Hay, S., *Flore laurentienne*. 3e éd. mise à jour et annotée / ed.; G. Morin: Boucherville, Québec, 2002.
16. Erichsen-Brown, C., *Medicinal and other uses of North American plants: a historical survey with special reference to the eastern Indian tribes*. Courier Corporation: 2013.

17. Kafka, V.; Quenneville, R., Cadre pour la restauration écologique du pin blanc et du chêne rouge au parc national du Canada Forillon. *Service de la conservation des écosystèmes, Parcs Canada* **2006**.
18. Stearns, F. In *Ecological characteristics of white pine*, White Pine Symposium Proceedings: History, Ecology, Policy and Management, 1992; pp 16-18.
19. Abrams, M. D., Eastern white pine versatility in the presettlement forest : this eastern giant exhibited vast ecological breadth in the original forest but has been on the decline with subsequent land-use changes. *BioScience* **2001**, *51* (11), 967-979.
20. Nolet, P. *Le pin blanc*; Institut Québécois d'Aménagement de la Forêt Feuillue: 2001.
21. Quenneville, R.; Thériault, M., Pin blanc d'Amérique : préservation. In *Encyclopédie du patrimoine culturel de l'Amérique française.*, 2009.
22. Association forestière des Cantons de l'Est, Les grands pins au Québec : un choix d'avenir. Partenariat innovation forêt; Ressources naturelles Canada, Eds. Québec, 2008.
23. Hepp, T. E.; Vimmerstedt, J. P.; Smalley, G. W.; McNab, W. H., Estimating yields of unthinned eastern white pine plantations from current stocking in the Southern Appalachians. *Forest Science* **2015**, *61* (1), 114-122.
24. Uprety, Y.; Asselin, H.; Bergeron, Y., Cultural importance of white pine (*Pinus strobus* L.) to the Kitcisakik Algonquin community of western Quebec, Canada. *Canadian Journal of Forest Research* **2013**, *43* (6), 544-551.
25. Sasseville, D., Médecine traditionnelle amérindienne et dermatologie. *Progrès en dermato-allergologie: Besançon 2012* **2012**, *18*, 95.
26. Moerman, D. E., *Native American medicinal plants : an ethnobotanical dictionary*. Timber Press: Portland, 2009.
27. Herrick, J. W., *Iroquois medical botany*. Syracuse University Press: 1995.
28. Costa, T.; Vieira, R. F.; Bizzo, H. R.; Silveira, D.; Gimenes, M. A., Secondary metabolites. *Chromatography and Its Applications* **2012**, p.131-164.
29. Demain, A. L.; Fang, A., The natural functions of secondary metabolites. *History of modern biotechnology I* **2000**, 1-39.
30. Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C., *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques: 2005.
31. Paasela, T.; Lim, K.-J.; Pietiainen, M.; Teeri, T. H., The Omethyltransferase PMT2 mediates methylation of pinosylvin in Scots pine. *New Phytologist* **2017**, *214* (4), 1537-1550.
32. Wallis, C. M.; Huber, D. P.; Lewis, K. J., Ecosystem, location, and climate effects on foliar secondary metabolites of lodgepole pine populations from central British Columbia. *Journal of chemical ecology* **2011**, *37*, 607-621.
33. Fernandez-Panchon, M.; Villano, D.; Troncoso, A.; Garcia-Parrilla, M., Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical reviews in food science and nutrition* **2008**, *48* (7), 649-671.
34. Mani, R.; Natesan, V., Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* **2018**, *145*, 187-196.
35. Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A., Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19* (10), 16240-16265.

36. Agrawal, A., Pharmacological activities of flavonoids: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol* **2011**, *4* (2), 1394-1398.
37. Neacsu, M.; Eklund, P.; Sjöholm, R.; Pietarinen, S.; Ahotupa, M.; Holmbom, B.; Willför, S., Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *European Journal of Wood and Wood Products* **2007**, *65* (1), 1-6.
38. Maimoona, A.; Naem, I.; Saddiqe, Z.; Ali, N.; Ahmed, G.; Shah, I., Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5* (13), 2724-2728.
39. Oleszek, W.; Stochmal, A.; Karolewski, P.; Simonet, A. M.; Macias, F. A.; Tava, A., Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown for nearly a century at the same area. *Biochemical Systematics and Ecology* **2002**, *30* (11), 1011-1022.
40. Shen, T.; Wang, X. N.; Lou, H. X., Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep* **2009**, *26* (7), 916-35.
41. Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguene, P., Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant science* **2009**, *177* (3), 143-155.
42. Belt, T.; Venalainen, M.; Harju, A., Non-destructive measurement of Scots pine heartwood stilbene content and decay resistance by means of UV-excited fluorescence spectroscopy. *Industrial Crops and Products* **2021**, *164*, 113395.
43. De Filippis, B.; Ammazalorso, A.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Amoroso, R., Anticancer activity of stilbene-based derivatives. *ChemMedChem* **2017**, *12* (8), 558-570.
44. Tian, B.; Liu, J., Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J Sci Food Agric* **2020**, *100* (4), 1392-1404.
45. Piotrowska, H.; Kucinska, M.; Murias, M., Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat Res* **2012**, *750* (1), 60-82.
46. Lee, S. K.; Lee, H. J.; Min, H. Y.; Park, E. J.; Lee, K. M.; Ahn, Y. H.; Cho, Y. J.; Pyee, J. H., Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* **2005**, *76* (2), 258-60.
47. Park, E.-J.; Park, H. J.; Chung, H.-J.; Shin, Y.; Min, H.-Y.; Hong, J.-Y.; Kang, Y.-J.; Ahn, Y.-H.; Pyee, J.-H.; Kook Lee, S., Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2012**, *23* (8), 946-952.
48. Koo, H. B.; Hwang, H.-S.; Han, J. Y.; Cheong, E. J.; Kwon, Y.-S.; Choi, Y. E., Enhanced production of pinosylvin stilbene with aging of *Pinus strobus* callus and nematicidal activity of callus extracts against pinewood nematodes. *Scientific reports* **2022**, *12* (1), 1-13.
49. Ninkuu, V.; Zhang, L.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Zeng, H., Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (11), 5710.
50. Cox-Georgian, D.; Ramadoss, N.; Dona, C.; Basu, C., Therapeutic and medicinal uses of terpenes. *Medicinal plants: from farm to pharmacy* **2019**, 333-359.
51. Sancho-Knapik, D.; Sanz, M. Á.; Peguero-Pina, J. J.; Niinemets, Ü.; Gil-Pelegrín, E., Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Annals of forest science* **2017**, *74*, 1-10.

52. Arrabal, C.; García-Vallejo, M. C.; Cadahia, E.; Cortijo, M.; de Simón, B. F., Characterization of two chemotypes of *Pinus pinaster* by their terpene and acid patterns in needles. *Plant systematics and Evolution* **2012**, *298*, 511-522.
53. Keeling, C. I.; Bohlmann, J., Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry* **2006**, *67* (22), 2415-2423.
54. Silva, S.; Costa, E.; Calhau, C.; Morais, R.; Pintado, M., Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical reviews in food science and nutrition* **2017**, *57* (14), 3072-3083.
55. Liazid, A.; Schwarz, M.; Varela, R. M.; Palma, M.; Guillén, D. A.; Brigui, J.; Macías, F. A.; Barroso, C. G., Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds. *Food and Bioproducts Processing* **2010**, *88* (2-3), 247-252.
56. Poljanšek, I.; Oven, P.; Vek, V.; Raitanen, J.-E.; Hemming, J.; Willför, S., Isolation of pure pinosylvins from industrial knotwood residue with non-chlorinated solvents. *Holzforchung* **2019**, *73* (5), 475.
57. Kallela, K.; Riganea, G.; Salema, R. B., Étude comparative des méthodes d'extraction appliquées dans l'optimisation des composés phénoliques dans les plantes médicinales. *Indexing and abstracting* **2021**, 118.
58. Fang, W.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Eklund, P.; Pineiro, E. C.; Poljanšek, I.; Oven, P.; Willför, S., Evaluation of selective extraction methods for recovery of polyphenols from pine. *Holzforchung* **2013**, *67* (8), 843-851.
59. Simard, F.; Legault, J.; Lavoie, S.; Mshvildadze, V.; Pichette, A., Isolation and identification of cytotoxic compounds from the wood of *Pinus resinosa*. *Phytotherapy Research* **2008**, *22* (7), 919-922.
60. 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* (4), 96.
61. Elbatreek, M. H.; Mahdi, I.; Ouchari, W.; Mahmoud, M. F.; Sobeh, M., Current advances on the therapeutic potential of pinocembrin: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, *157*, 114032.
62. Hanawa, F.; Yamada, T.; Nakashima, T., Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* **2001**, *57* (2), 223-228.
63. Yamada, T.; Ito, S.-i., Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* infection. *Japanese Journal of Phytopathology* **1993**, *59* (6), 666-672.
64. Cheng, M.; Cheng, Y.-S.; Chang, C.; Wang, Y., Structure of (2R, 3R)-3-acetoxy-5, 7-dihydroxy-6-methylflavanone. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* **1990**, *46* (4), 719-720.
65. Fang, J.-M.; Chang, C.-F.; Cheng, Y.-S., Flavonoids from *Pinus morrisonicola*. *Phytochemistry* **1987**, *26* (9), 2559-2561.
66. Alvarez Novoa, J.; Erdtman, H.; Lindstedt, G., Constituents of Pine heartwood. XVIII. A note on cryptostrobin, an isomer of strobopin from the heartwood of *Pinus strobus* L. *Acta Chemica Scandinavica* **1950**, *4* (1), 390-1.
67. Matsuura, S., The Structure of Cryptostrobin and Strobopin, the Flavanones from the Heartwood of *Pinus strobus*. *Pharmaceutical bulletin* **1957**, *5* (3), 195-198.

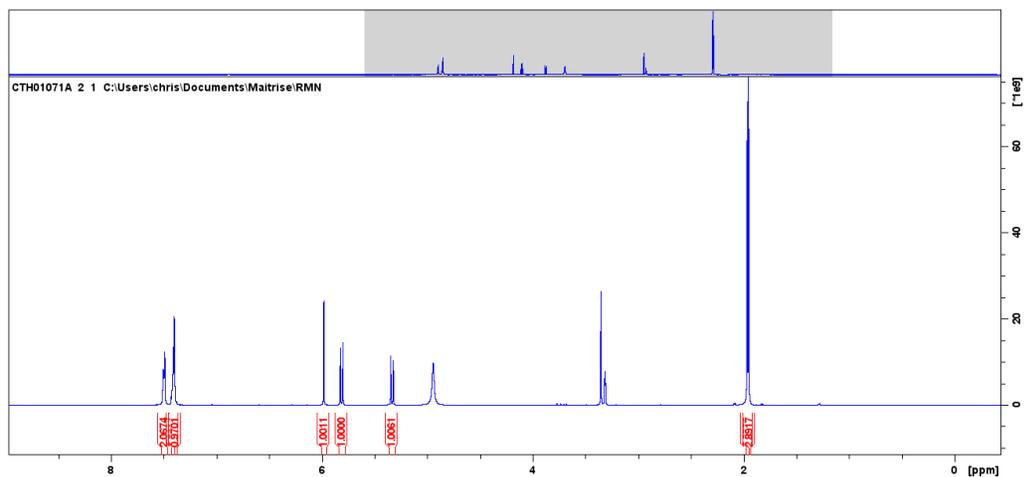
68. Vechi, G.; da Silva, R. d. C. M. V. d. A. F.; de Souza, P.; da Silva, L. M.; de Andrade, S. F.; Cechinel Filho, V., Cryptostrobin and catechin isolated from *Eugenia mattosii* D. Legrand leaves induce endothelium-dependent and independent relaxation in spontaneously hypertensive rat aorta. *Pharmacological reports : PR* **2019**, *71* (5), 950-957.
69. Erdtman, H., The phenolic constituents of Pine heartwood. V. The heartwood of *Pinus strobus*. *Translations. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia* **1950**, No.1157 p.14.
70. Park, M. H.; Hong, J. E.; Park, E. S.; Yoon, H. S.; Seo, D. W.; Hyun, B. K.; Han, S.-B.; Ham, Y. W.; Hwang, B. Y.; Hong, J. T., Anticancer effect of tectochrysin in colon cancer cell via suppression of NF-kappaB activity and enhancement of death receptor expression. *Molecular cancer* **2015**, *14*, 1-12.
71. Lee, S.; Kim, K. S.; Park, Y.; Shin, K. H.; Kim, B.-K., In vivo anti-oxidant activities of tectochrysin. *Archives of pharmacal research* **2003**, *26*, 43-46.
72. Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Muñoz-Martínez, F.; Bates, S. E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Pérez-Victoria, J. M., Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer research* **2005**, *65* (11), 4852-4860.
73. Lindberg, L.; Willför, S.; Holmbom, B., Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2004**, *31* (3), 137-147.
74. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Waffo-Tégou, P.; Pedrot, E.; Richard, T.; Mérillon, J. M.; Valls Fonayet, J., Separation and isolation of major polyphenols from maritime pine (*Pinus pinaster*) knots by two-step centrifugal partition chromatography monitored by LC-MS and NMR spectroscopy. *Journal of separation science* **2020**, *43* (6), 1080-1088.
75. Zhou, Z.; Zhou, T., Synthesis and antibacterial activity of C-7 acylhydrazone derivatives of dehydroabietic acid. *Journal of Chemical Research* **2018**, *42* (8), 405-407.
76. Bleif, S.; Hannemann, F.; Lisurek, M.; von Kries, J. P.; Zapp, J.; Dietzen, M.; Antes, I.; Bernhardt, R., Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase. *ChemBioChem* **2011**, *12* (4), 576-582.
77. Isyaka, S. M.; Mas-Claret, E.; Langat, M. K.; Hodges, T.; Selway, B.; Mbala, B. M.; Mvingu, B. K.; Mulholland, D. A., Cytotoxic diterpenoids from the leaves and stem bark of *Croton haumanianus* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* **2020**, *178*, 112455.
78. Otaka, J.; Komatsu, M.; Miyazaki, Y.; Futamura, Y.; Osada, H., Two new triterpenoids from the roots of *Pinus densiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2017**, *81* (3), 449-452.
79. Yang, N.-Y.; Liu, L.; Tao, W.-W.; Duan, J.-A.; Tian, L.-J., Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells. *Phytochemistry* **2010**, *71* (13), 1528-1533.
80. Hu, C.-L.; Xiong, J.; Gao, L.-X.; Li, J.; Zeng, H.; Zou, Y.; Hu, J.-F., Diterpenoids from the shed trunk barks of the endangered plant *Pinus dabeshanensis* and their PTP1B inhibitory effects. *RSC advances* **2016**, *6* (65), 60467-60478.

81. Yang, X.-W.; Feng, L.; Li, S.-M.; Liu, X.-H.; Li, Y.-L.; Wu, L.; Shen, Y.-H.; Tian, J.-M.; Zhang, X.; Liu, X.-R., Isolation, structure, and bioactivities of abiesadines A–Y, 25 new diterpenes from *Abies georgei* Orr. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18* (2), 744-754.
82. Cheng, J.; Fu, S.; Qin, Z.; Han, Y.; Yang, X., Self-assembled natural small molecule diterpene acids with favorable anticancer activity and biosafety for synergistically enhanced antitumor chemotherapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2021**, *9* (11), 2674-2687.
83. Degenhardt, A. G.; Hofmann, T., Bitter-tasting and kokumi-enhancing molecules in thermally processed avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**, *58* (24), 12906-12915.
84. Xie, K.; Miles, E. A.; Calder, P. C., A review of the potential health benefits of pine nut oil and its characteristic fatty acid pinolenic acid. *Journal of Functional Foods* **2016**, *23*, 464-473.
85. Suga, T.; Ohta, S.; Munesada, K.; Ide, N.; Kurokawa, M.; Shimizu, M.; Ohta, E., Endogenous pine wood nematocidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. *Phytochemistry* **1993**, *33* (6), 1395-1401.
86. Smolarz, H. D.; Mendyk, E.; Bogucka-Kocka, A.; Kockic, J., Pinostrobin—an anti-leukemic flavonoid from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2006**, *61* (1-2), 64-68.
87. Patel, N. K.; Jaiswal, G.; Bhutani, K. K., A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. *Nat Prod Res* **2016**, *30* (18), 2017-27.
88. Yang, X.; Wang, X.; Chen, X.-Y.; Ji, H.-Y.; Zhang, Y.; Liu, A.-J., Pinocembrin–lecithin complex: Characterization, solubilization, and antioxidant activities. *Biomolecules* **2018**, *8* (2), 41.
89. Shimoda, K.; Kubota, N.; Uesugi, D.; Kobayashi, Y.; Hamada, H.; Hamada, H., Glycosylation of stilbene compounds by cultured plant cells. *Molecules* **2020**, *25* (6), 1437.
90. Wadzinski, T. J.; Steinauer, A.; Hie, L.; Pelletier, G.; Schepartz, A.; Miller, S. J., Rapid phenolic O-glycosylation of small molecules and complex unprotected peptides in aqueous solvent. *Nature chemistry* **2018**, *10* (6), 644-652.
91. Jakob, M.; Harrer, H., Fungicidally active polymer dispersions and use thereof. Google Patents: 2008.
92. Lindberg, B., Glucosides of pinosylvin and its monomethyl ether. *Acta Chem. Scand* **1948**, *2*, 872.
93. Gabaston, J.; Richard, T.; Biais, B.; Waffo-Teguo, P.; Pedrot, E.; Jourdes, M.; Corio-Costet, M.-F.; Mérillon, J.-M., Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Industrial Crops and Products* **2017**, *103*, 267-273.
94. Woodward, S.; Pearce, R., The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiological and molecular plant pathology* **1988**, *33* (1), 127-149.
95. Laavola, M.; Nieminen, R.; Leppanen, T.; Eckerman, C.; Holmbom, B.; Moilanen, E., Pinosylvin and monomethylpinosylvin, constituents of an extract from the knot of *Pinus sylvestris*, reduce inflammatory gene expression and inflammatory

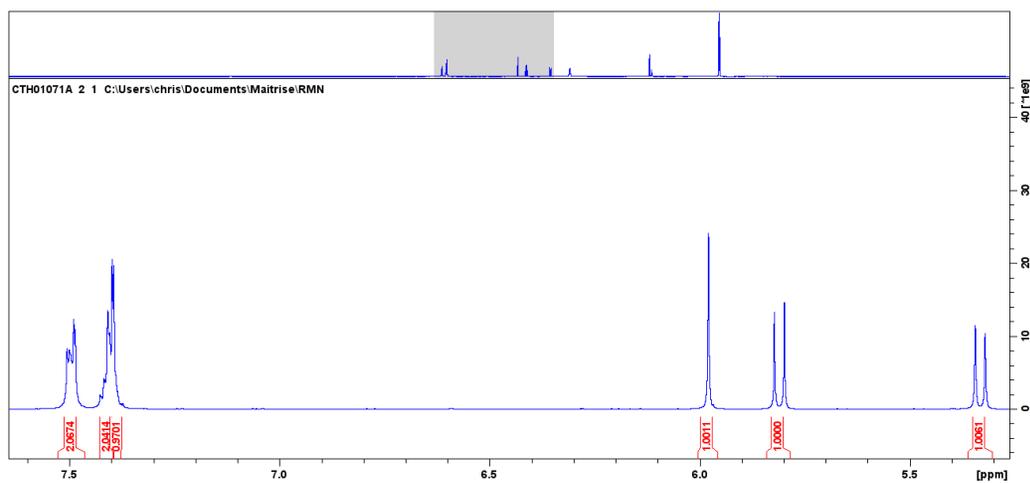
- responses in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63* (13), 3445-53.
96. Matsuda, H.; Kageura, T.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Harima, S.; Yoshikawa, M., Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2000**, *10* (4), 323-327.
97. Singleton, V. L.; Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16* (3), 144-158.
98. Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin, C., Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **2003**, *52* (5), 796-800.
99. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., 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.
100. 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* (2), 720-726.
101. Green, S. J.; Meltzer, M. S.; Hibbs Jr, J. B.; Nacy, C. A., Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **1990**, *144* (1), 278-283.
102. 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* (17), 5421-5426.

ANNEXES – SPECTRES RMN

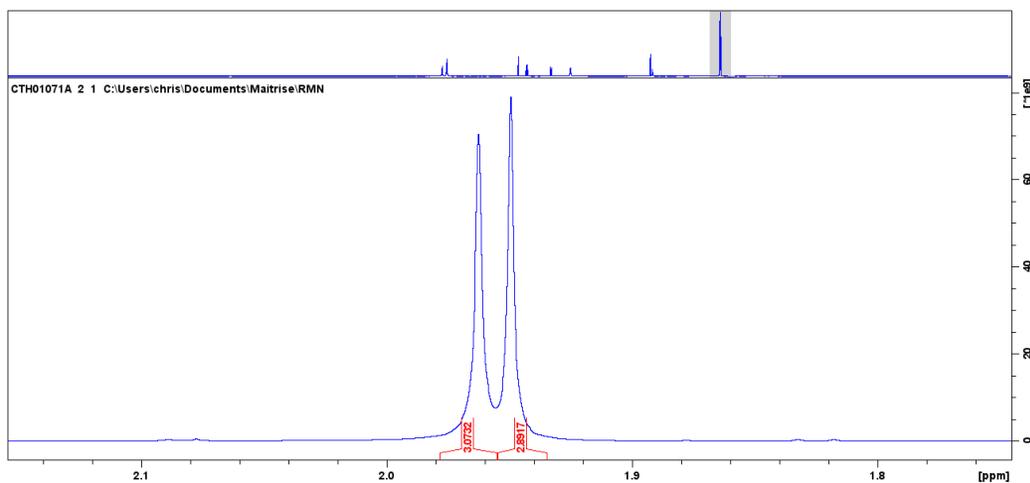
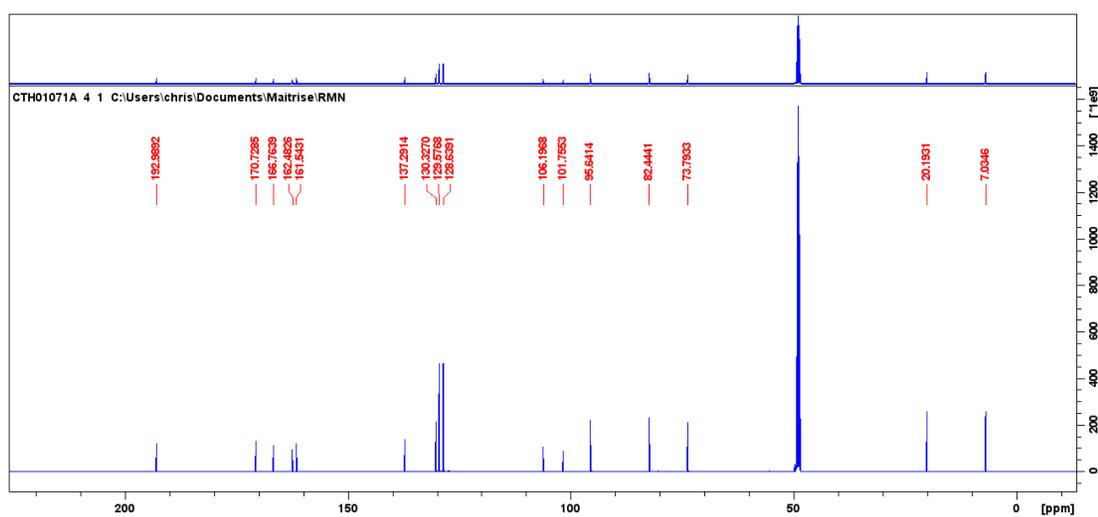
Annexe 1 : Spectres RMN de la 3-acétoxy-5, 7-dihydroxy-6-méthyl-flavanone **3**

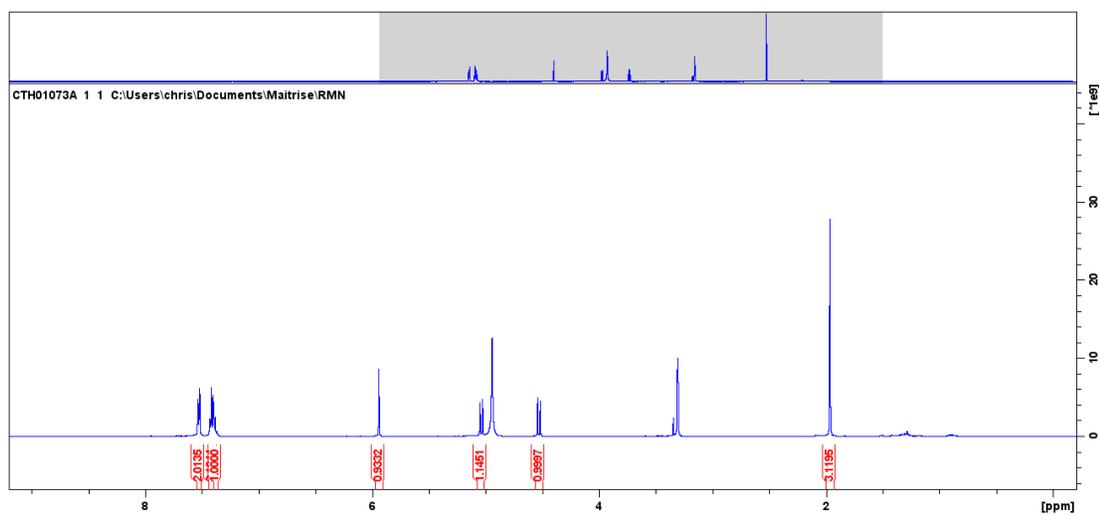
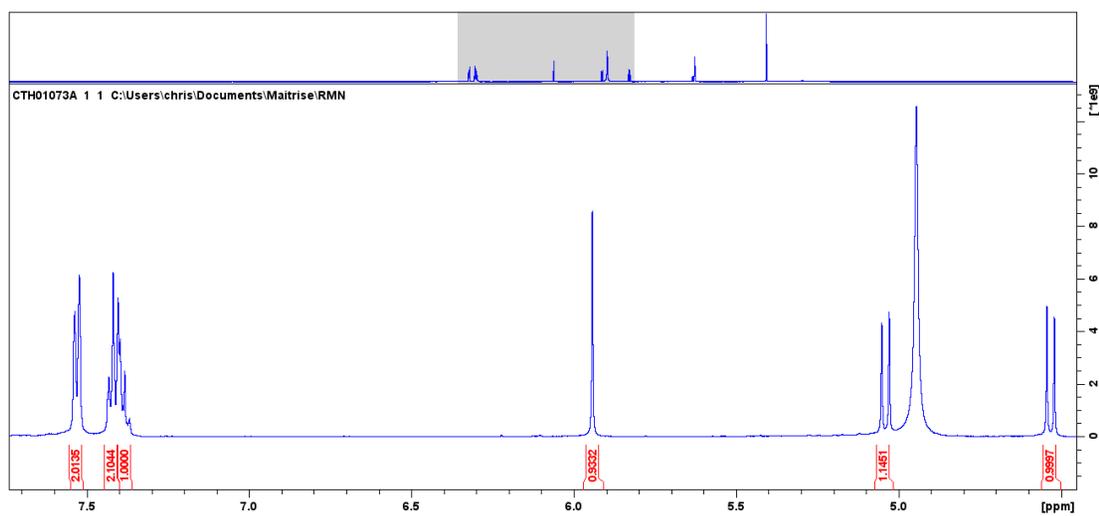


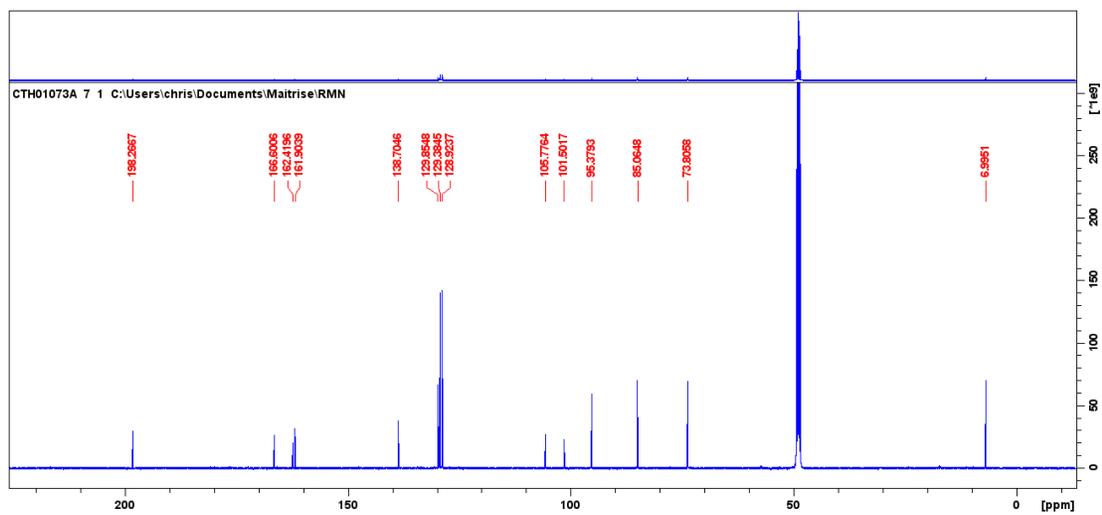
Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **3**



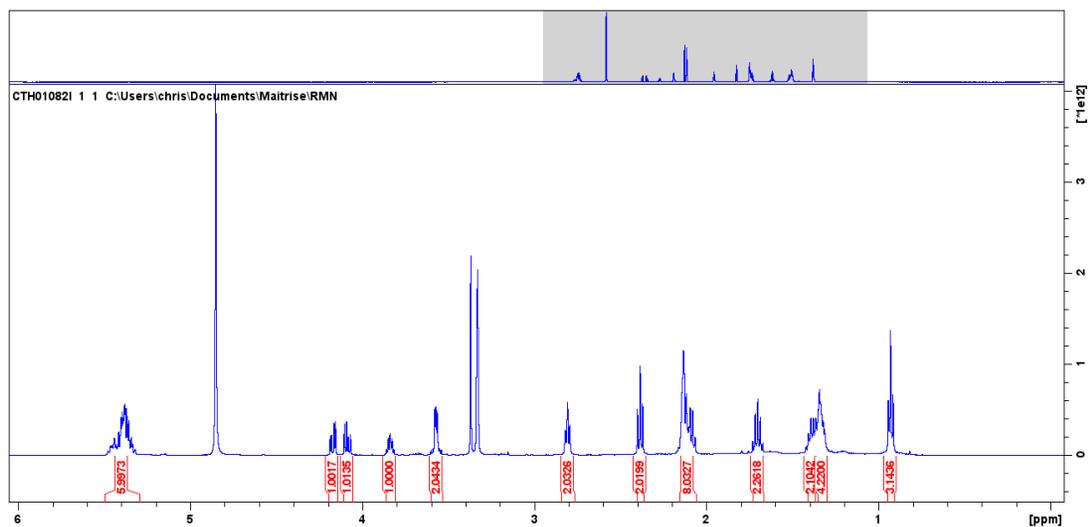
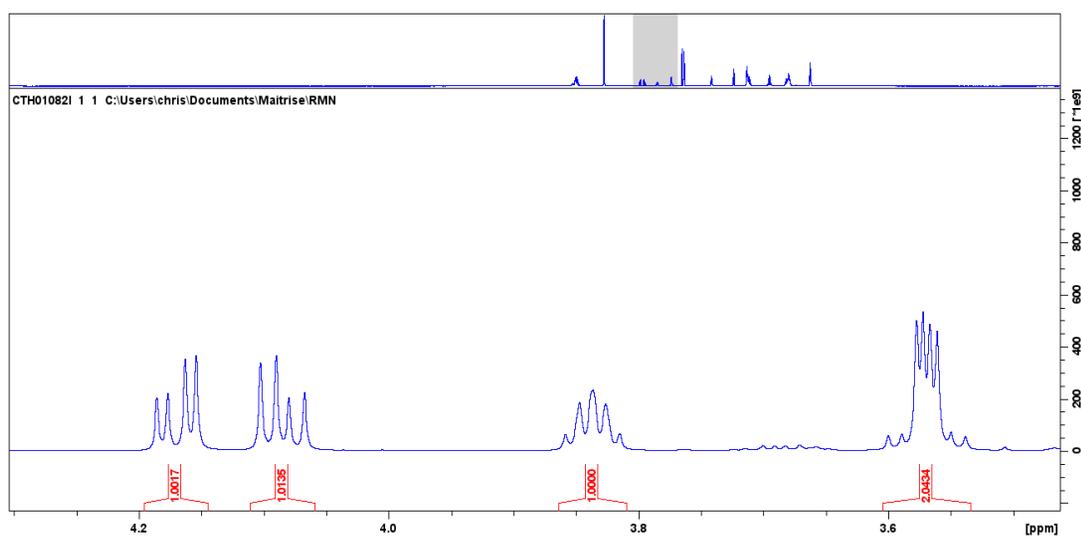
Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **3**

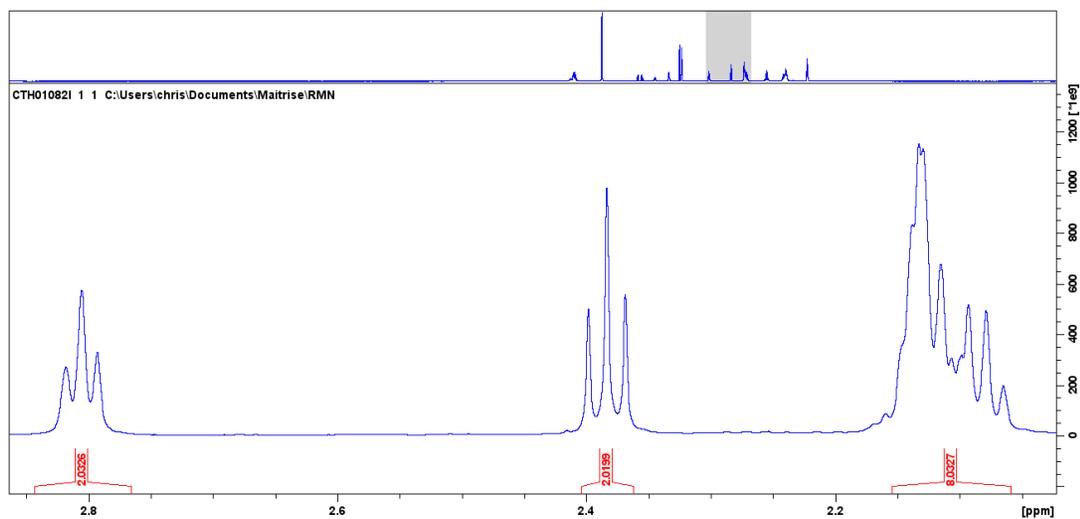
Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **3**Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) de **3**

Annexe 2 : Spectres RMN de la 3,5,7-trihydroxy-6-méthyl-flavanone 5Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de 5Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de 5

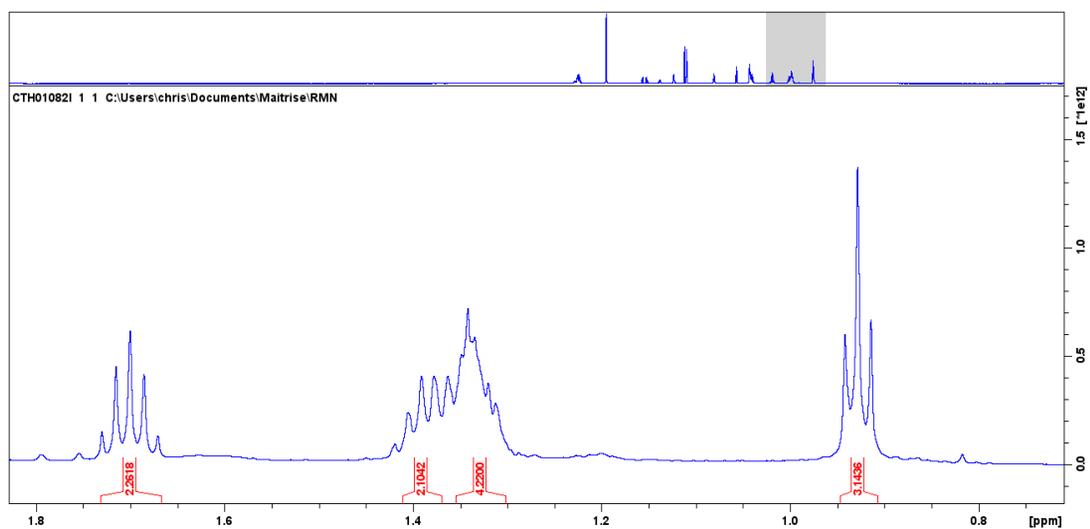


Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) de 5

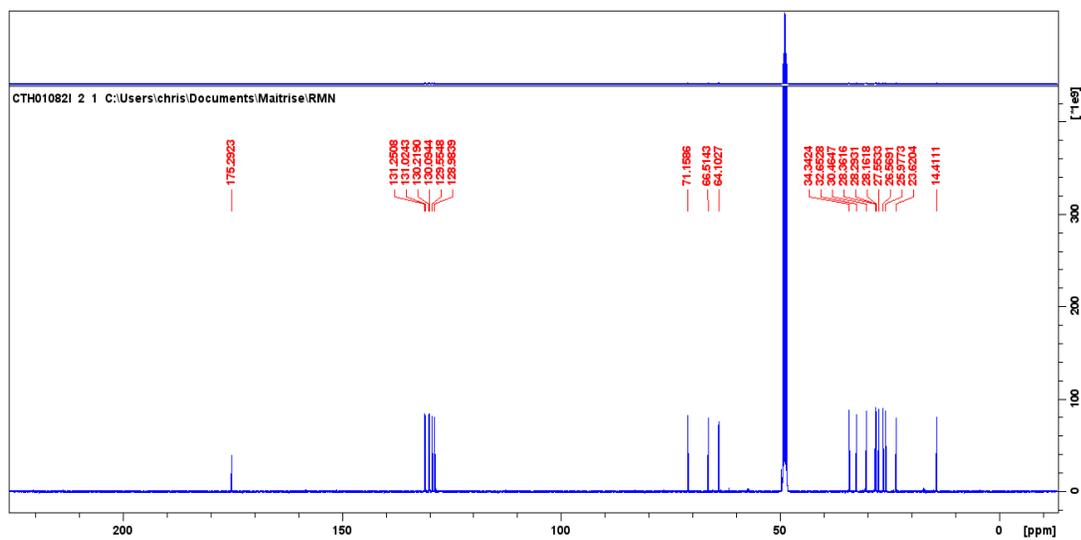
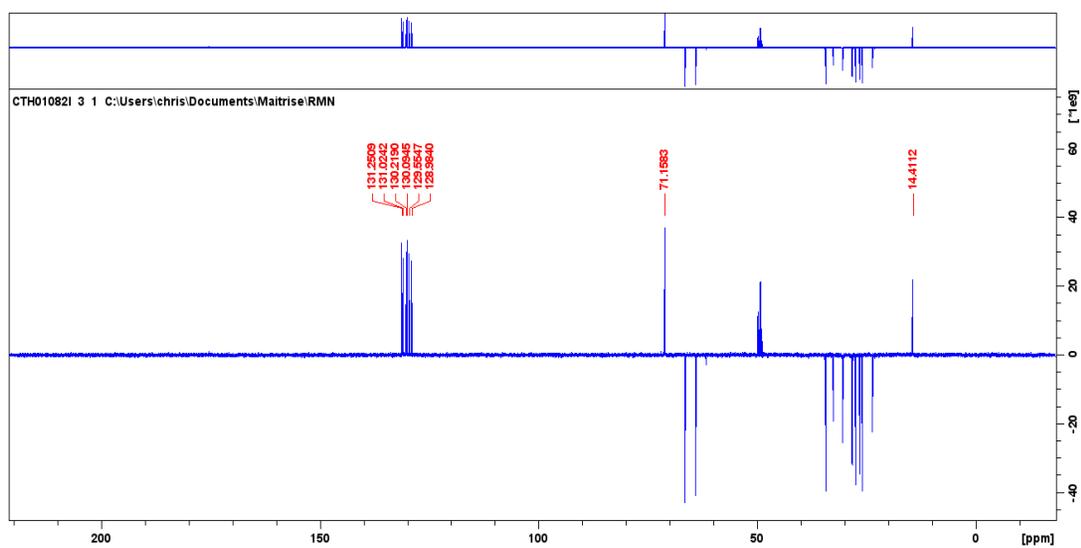
Annexe 3 : Spectres RMN du 1-monoglycérade d'acide pinolénique **13**Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **13**Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **13**

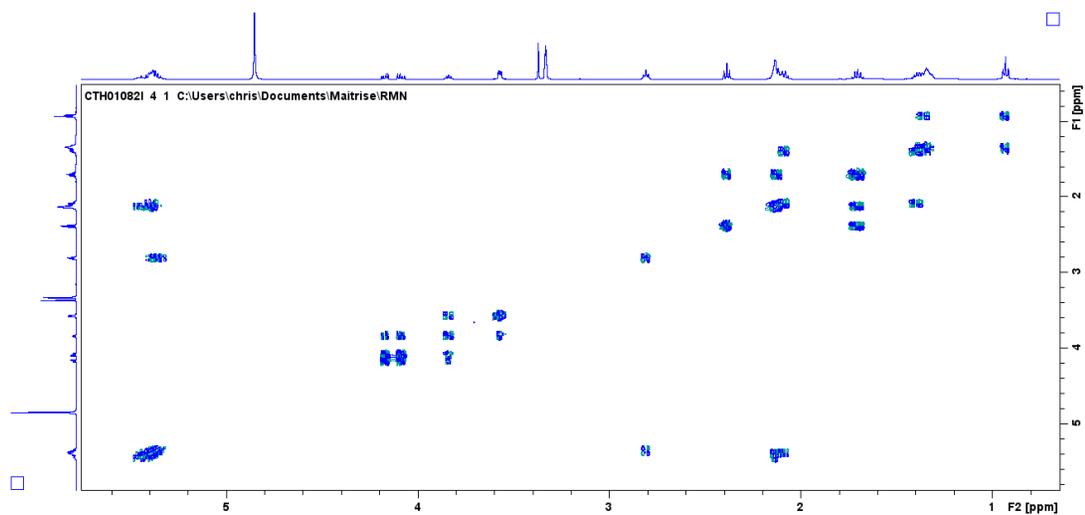
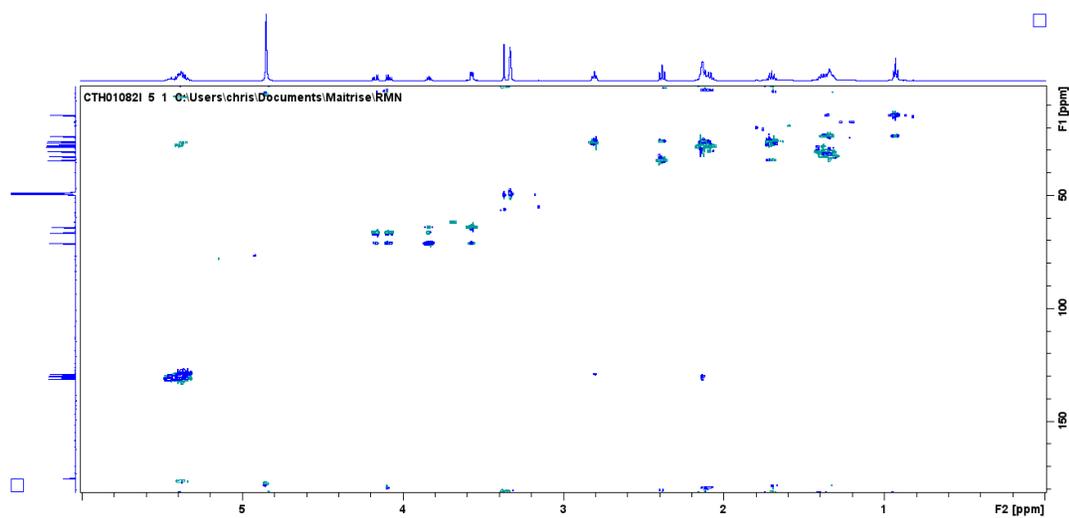


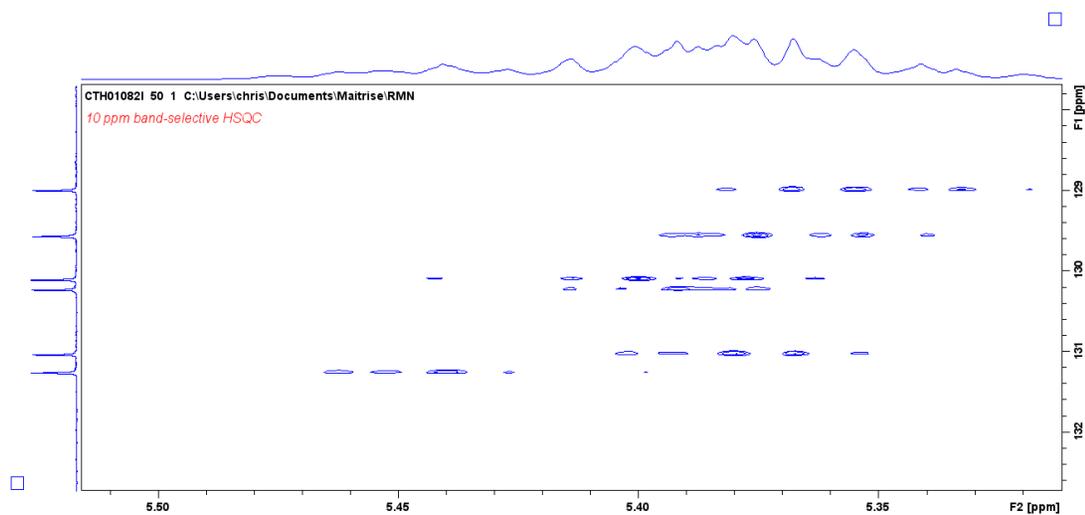
Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **13**



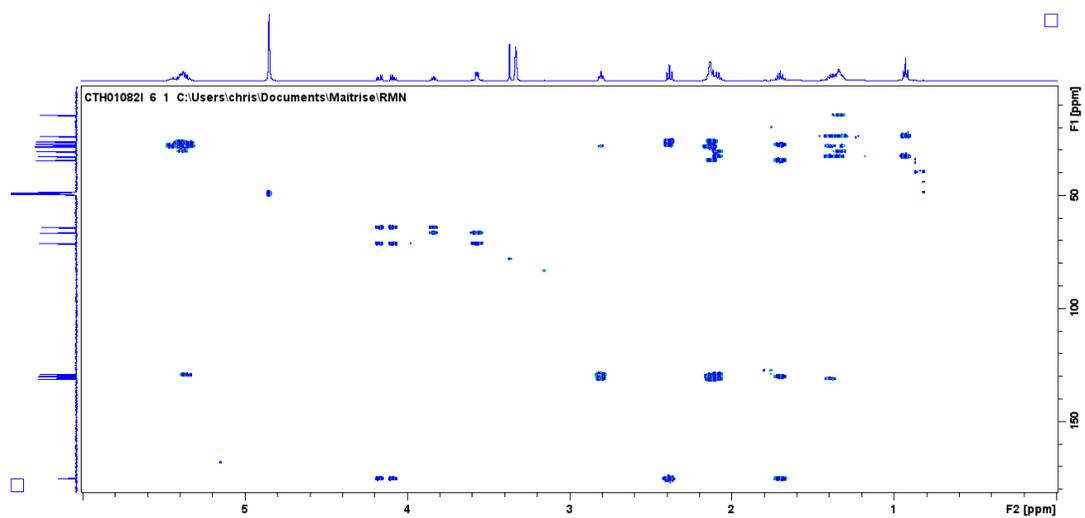
Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **13**

Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) de **13**Spectre RMN DEPT (CD_3OD , 500 MHz) de **13**

Spectre RMN COSY (CD₃OD, 500 MHz) de **13**Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 500 MHz) de **13**



Aggrandissement du spectre RMN HSQC Band selective 10 ppm (CD₃OD, 500 MHz) de **13**



Spectre RMN HMBC (CD₃OD, 500 MHz) de **13**

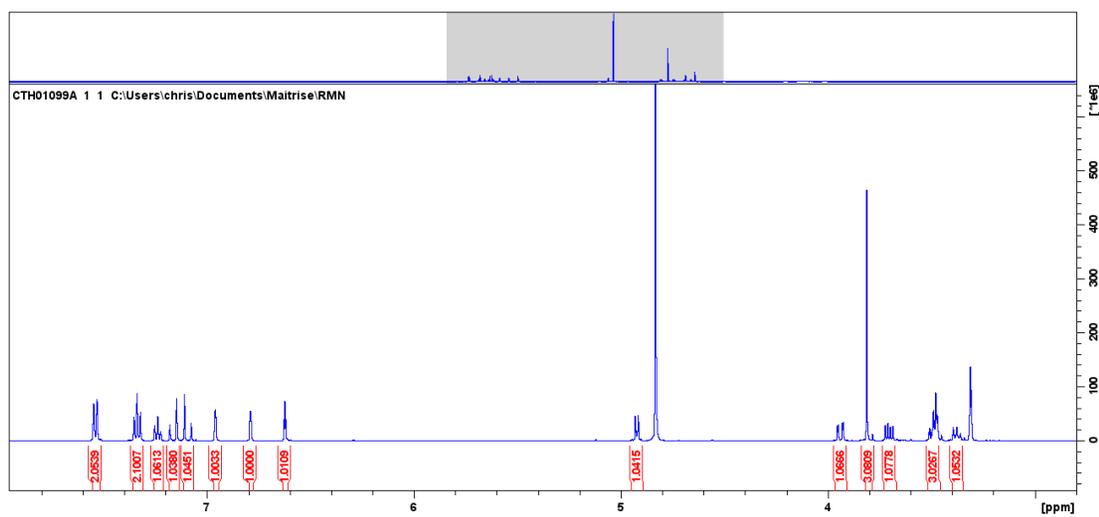
Tableau d'assignation des carbones de **13** selon les corrélations HSQC et HMBC

dC	POSITION (C-)	TYPE	HSQC	HSQC	HMBC	HMBC	HMBC	HMBC
175.2923	1	C			4.17	4.08	2.38	1.70
131.2508	9	CH	5.4411		2.12			
131.0243	13	CH	5.3624		2.0843			
130.219	5	CH	5.3866					
130.0944	6	CH	5.4018		2.1213	1.70		
129.5548	10	CH	5.3428		2.81			
128.9839	12	CH	5.3195		2.0843			
71.1586	2'	CH	3.84		4.17	4.08	3.57	
66.5143	1'	CH2	4.17	4.08	3.84	3.57		
64.1027	3'	CH2	3.57		4.17	4.08	3.84	
34.3424	2	CH2	2.38		2.1213	1.70		
32.6528	16	CH2	1.32		2.0843	1.34	0.93	
30.4647	15	CH2	1.39		2.0843	1.32		
28.3616	8	CH2	2.1416					
28.2931	7	CH2	2.1219		2.1416	5.4411		
28.1618	14	CH2	2.0843		5.3195	1.39		
27.5533	4	CH2	2.1213		2.38	1.70	5.4018	
26.5691	11	CH2	2.81		5.4018	2.1213	5.3624	
25.9773	3	CH2	1.70		2.38			
23.6204	17	CH2	1.34		0.93			
14.4111	18	CH3	0.93		1.32			

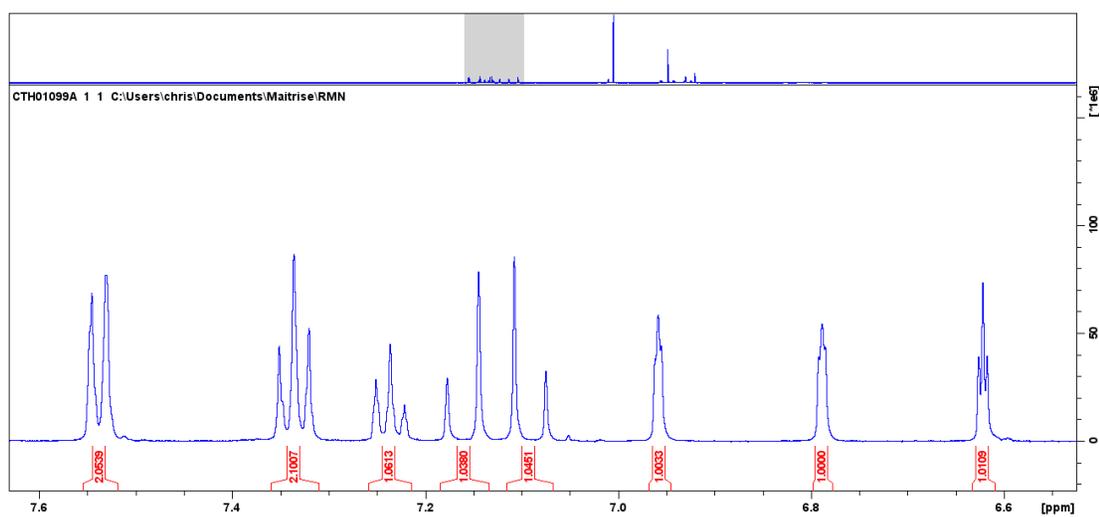
Tableau d'assignation des protons hydrogènes de **13** selon les corrélations COSY

PROTON (dC)	POSITION (C-)	TYPE	INT.	JHH1	JHH2	COSY	COSY	COSY
5.4411	9	m	1					
5.4018	6	m	1			2.1219		
5.3866	5	m	1					
5.3624	13	m	1					
5.3428	10	m	1			2.81		
5.3195	12	m	1					
4.17	1'	dd	1	4.42	11.37	4.08	3.84	
4.08	1'	dd	1	6.32	11.37	4.17	3.84	
3.84	2'	c	1	5.58	10.86	4.17	4.08	3.57
3.57	3'	dd	2	2.50	5.36	3.84		
2.81	11	t	2	6.54		5.3428		
2.38	2	t	2	7.48		1.70		
2.1416	8	m	2					
2.1219	7	m	2			5.4018		
2.1213	4	m	2			1.70		
2.0843	14	t	2	7,20		1.39		
1.70	3	c	2	7.50	14.70	2.1213	2.38	
1.39	15	c	2	7.2	14,11	2.0843		
1.34	17	m	2			0.93		
1.32	16	m	2					
0.93	18	t	3	6,4		1.34		

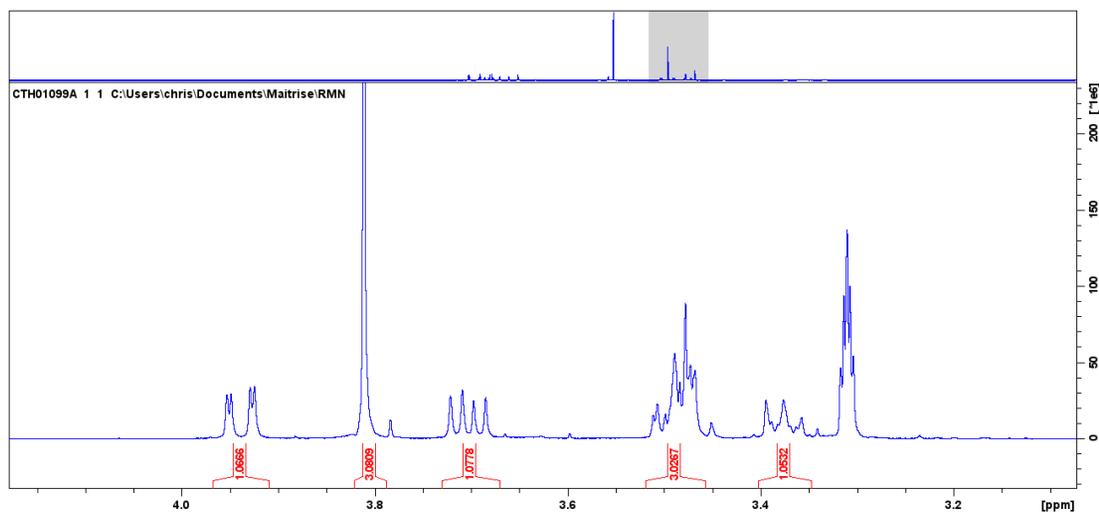
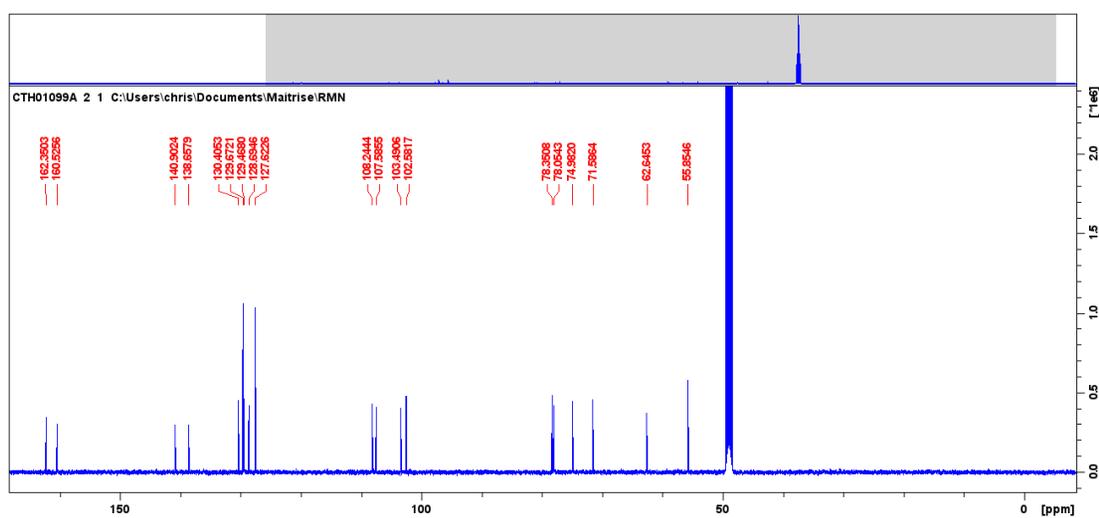
Annexe 4 : Spectres RMN du (-)-5-O- β -D-glucopyranosyl-monométhyléther de pinosylvine 17

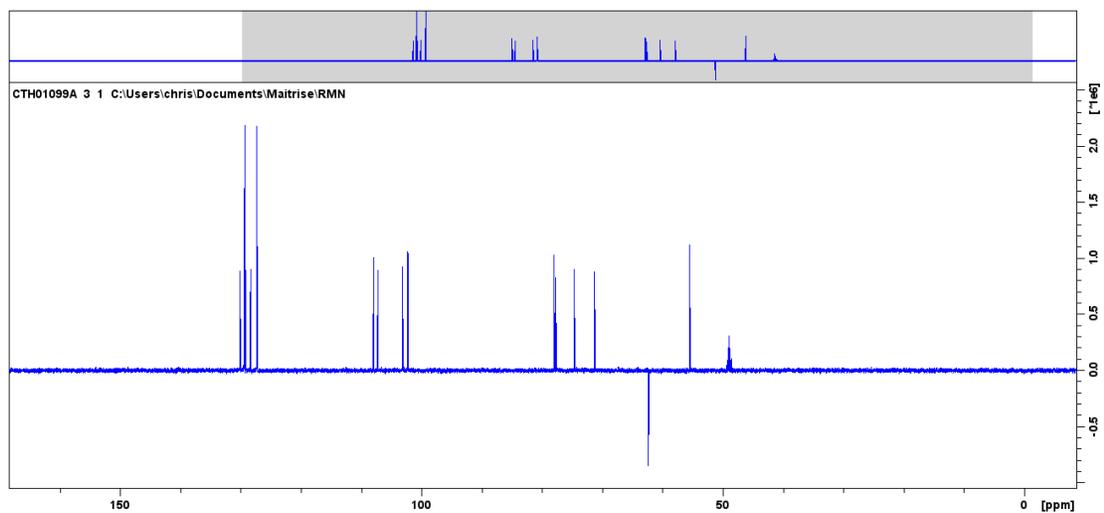
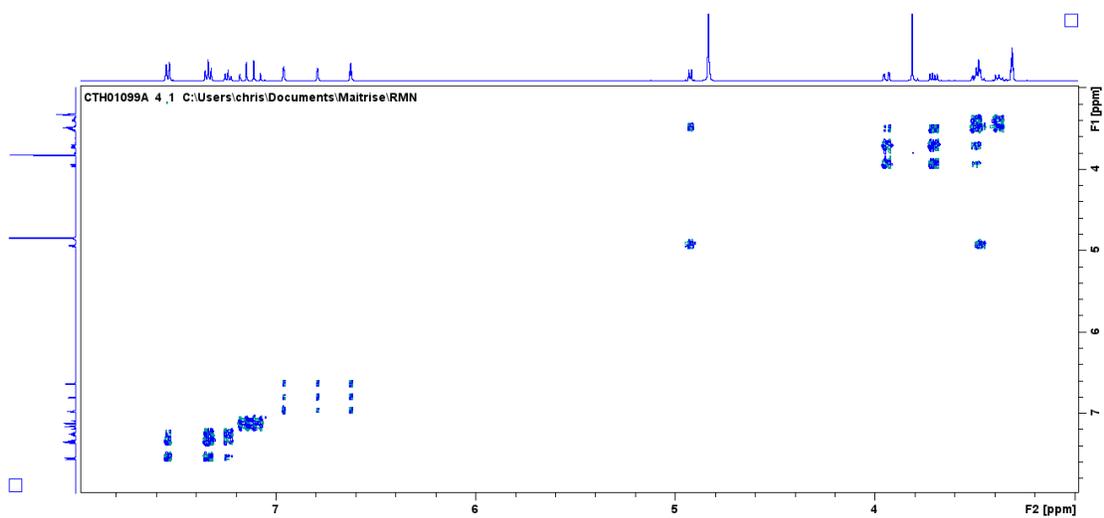


Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de 17



Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de 17

Agrandissement du spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **17**Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) de **17**

Spectre RMN DEPT (CD₃OD, 500 MHz) de 17Spectre RMN COSY (CD₃OD, 500 MHz) de 17

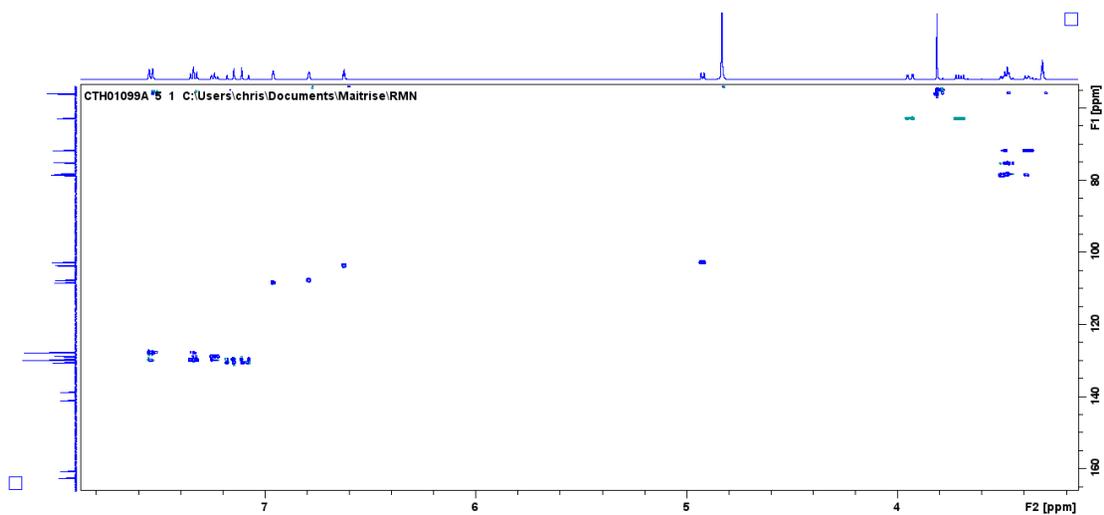
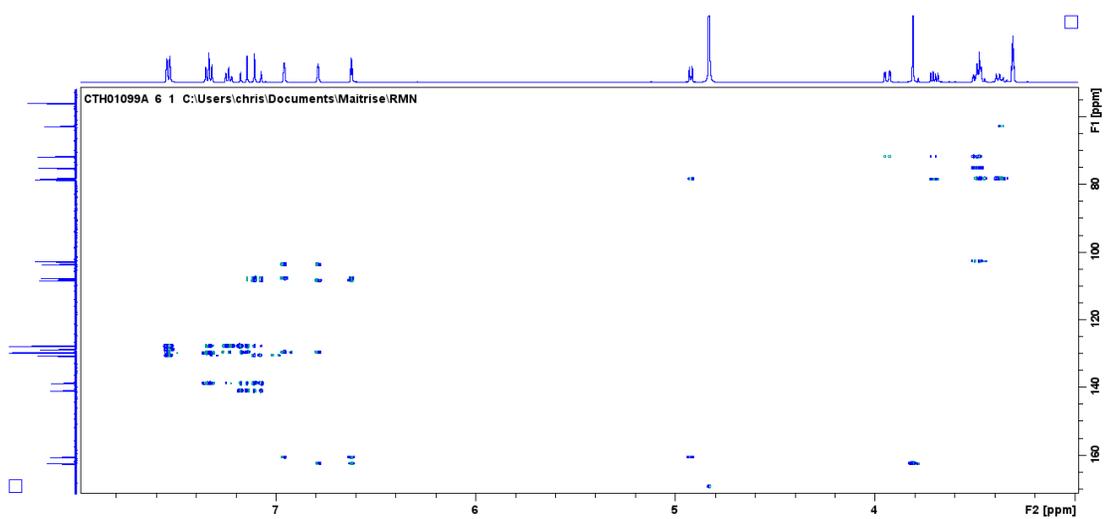
Spectre RMN HSQC (CD₃OD, 500 MHz) de 17Spectre RMN HMBC (CD₃OD, 500 MHz) de 17

Tableau d'assignation des carbones de **17** selon les corrélations HSQC et HMBC

dC	POSITION (C-)	TYPE	HSQC	HSQC	HMBC	HMBC	HMBC
162.35	3	C			6,79	6,62	3,81
160.53	5	C			6,96	6,62	4,92
140.90	1	C			7,16	7,09	
138.66	1'	C			7,34	7,16	7,09
130.41	8	CH	7,16		7,54	7,09	
129.67	3',5'	CH	7,34				
129.47	7	CH	7,09		7,16	6,96	6,79
128.69	4'	CH	7,24		7,54		
127.62	2',6'	CH	7,54		7,34	7,24	7,16
108.24	6	CH	6,96		7,09	6,79	6,62
107.59	2	CH	6,79		7,09	6,96	6,62
103.49	4	CH	6,62		6,96	6,79	
102.58	9	CH	4,92		3,49		
78.35	13	CH	3,49		3,70		
78.05	11	CH	3,49		4,92	3,38	
74.98	10	CH	3,49				
71.59	12	CH	3,38		3,94	3,70	3,49
62.65	14	CH2	3,70	3,94			
55.85	3-OCH3	CH3	3,81				

Tableau d'assignation des protons hydrogènes de **17** selon les corrélations COSY

PROTON (dC)	POSITION (C-)	TYPE	INT.	JHH1	JHH2	COSY	COSY	COSY	COSY
7,54	2',6'	d	2	7,8		7,34			
7,34	3',5'	t	2	7,8		7,54	7,24		
7,24	4'	t	1	7,3		7,34			
7,16	8	d	1	16,4		7,09			
7,09	7	d	1	16,4		7,16			
6,96	6	t	1	1,8		6,79	6,62		
6,79	2	t	1	1,8		6,96	6,62		
6,62	4	t	1	2,3		6,96	6,79		
4,92	9	d	1	7,3		3,49			
3,94	14	dd	1	2,2	12,0	3,49	3,70		
3,81	3-OCH3	s	3						
3,70	14	dd	1	6,3	12,0	3,49	3,94		
3,49	10,11,13	m	3			4,92	3,94	3,70	3,38
3,38	12	t	1	9,0		3,49			