



Valorisation d'extraits naturels par hémisynthèse biomimétique de dihydrochalcones antibactériennes

par Antoine Desportes

B.Sc

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 (Chimie des produits naturels)

Québec, Canada

© Antoine Desportes, 2024

RÉSUMÉ

La résistance aux agents antimicrobiens (RAM) est un phénomène naturel répandu chez de nombreuses bactéries mais ayant pris une ampleur alarmante depuis l'introduction massive de molécules antibactériennes au sein des populations humaines et animales au cours des dernières décennies. L'émergence et la propagation de bactéries résistantes aux antimicrobiens est un problème contemporain majeur qui nécessite, entre autres, le développement de nouveaux composés antibactériens n'étant pas susceptible à la RAM. Dans cette optique et en lien avec l'utilisation traditionnelle des bourgeons de peuplier baumier (*Populus balsamifera*), l'équipe du Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) a identifié une nouvelle famille de composés naturels antibactériens : les balsacones. Celles-ci ont une activité antibactérienne intéressante contre le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) et le staphylocoque doré résistant à la méticilline (SARM), une souche multirésistante particulièrement problématique dans le milieu hospitalier. Cependant, malgré cette activité antibactérienne intéressante, l'isolation des balsacones dans les bourgeons de peuplier baumier est fastidieuse et onéreuse, ce qui représente un défi de production. Quant à elle, la synthèse totale des balsacones nécessite de nombreuses étapes et repose sur l'utilisation de précurseurs non renouvelables issus de la pétrochimie. Une alternative attrayante est l'hémisynthèse des balsacones à partir des dihydrochalcones (DHC) précurseurs présentes dans les bourgeons de *P. balsamifera*. Cependant, cette méthode requiert aussi des étapes d'isolation pour obtenir ces DHC. Ces différents enjeux encouragent donc la recherche de voies innovantes de production des balsacones.

Ce projet de maîtrise consistait à mettre au point et à optimiser une nouvelle méthode de production de balsacones. Cette approche alternative consiste à convertir les DHC en balsacones directement dans un extrait de bourgeons de *P. balsamifera*. Cette hémisynthèse *in situ*, repose sur une alkylation de Friedel-Crafts des DHC présentes dans l'extrait avec de l'alcool 4-hydroxycinnamique. Cette méthode de production est inspirée d'une voie biosynthétique plausible des balsacones et répond à plusieurs principes de la chimie verte par l'innocuité des réactifs utilisés, par l'utilisation de substrats biosourcés, par l'utilisation d'un catalyseur recyclable et par l'économie d'atomes et d'énergie.

Le dosage des DHC et des balsacones dans les extraits enrichis a permis de les quantifier et d'optimiser les conditions expérimentales menant à l'enrichissement en balsacones A, B et C. Par ailleurs, la comparaison des profils chromatographiques des extraits naturels et des extraits enrichis soutient l'hypothèse sur la voie biosynthétique des balsacones.

L'enrichissement de l'extrait en balsacones se traduit par une augmentation de l'activité biologique contre *S. aureus* et 10 souches de SARM. Les extraits offrent également une faible cytotoxicité (CMI₅₀) sur les cellules des fibroblastes humains normaux (WS-1), supérieure à la concentration requise pour atteindre les CMI₉₀ contre *S. aureus* et le SARM.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES SCHEMAS	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	5
REVIEW DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 Phénomène de résistance aux agents antimicrobiens	5
1.1.1 Considérations générales	5
1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la métiline (SARM).....	8
1.2 Dihydrochalcones et balsacones.....	10
1.2.1 Généralités sur les dihydrochalcones.....	10
1.2.2 Généralités sur les balsacones.....	14
1.2.3 Enjeux de production des balsacones	17
1.2.4 Hypothèse biosynthétique.....	23
1.2.5 Hémisynthèse biomimétique et verte des balsacones	25
1.3 Hypothèses et objectifs.....	34
CHAPITRE 2.....	36
RESULTATS ET DISCUSSION	36
2.1 Potentialisations.....	36
2.1.1 Extraction et fractionnement.....	36
2.1.2 Essais préliminaires d'hémisynthèse <i>in situ</i>	37
2.1.3 Optimisation de l'hémisynthèse <i>in situ</i>	38
2.1.4 Recyclage de l'APTS supporté	41
2.2 Dosage par CLHP et analyses par CL-SM.....	42
2.2.1 Production des standards pour les dosages	42
2.2.1.1 Production des DHCb 9 et DHCc 10	42
2.2.1.2 Production de la DHCa 8 à partir de <i>K. angustifolia</i>	43
2.2.1.3 Synthèse des balsacones 25 à 28.....	45

2.2.2	Dosage par CLHP des DHC et des balsacones dans les extraits ..	47
2.2.3	Autres analyses par CLHP et CL-MS.....	53
2.2.4	Caractère biomimétique de l'hémisynthèse.....	58
2.3	Tests biologiques.....	60
CHAPITRE 3.....		69
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		69
3.1	Conclusion.....	69
3.2	Perspectives.....	70
CHAPITRE 4.....		72
PARTIE EXPERIMENTALE.....		72
4.1	Informations générales.....	72
4.1.1	Analyses spectrales et chromatographiques.....	72
4.1.2	Matériel végétal.....	74
4.2	Extraction et fractionnement de l'extrait de bourgeons de <i>P. balsamifera</i> 74	
4.3	Synthèse de l'alcool 4-hydroxycinnamique 80.....	76
4.4	Production de la DHCa 8.....	77
4.5	Synthèse de la DHCb 9 et de la DHCc 10.....	78
4.6	Synthèse des balsacones 25 à 28.....	79
4.7	Hémisynthèses <i>in situ</i>	81
4.8	Tests biologiques.....	82
BIBLIOGRAPHIE.....		84
ANNEXES.....		90

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : DATE DE MISE SUR LE MARCHÉ ET D'APPARITION DE RÉSISTANCES FACE AUX ANTIBIOTIQUES (INSPIRÉ DE PALUMBI ²¹).....	5
TABLEAU 2 : SOURCES DE DHC (8 À 10) PRÉCURSEURS DES BALSACONES A, B ET C (25 À 27).....	34
TABLEAU 3 : DOSAGE DES DHC (8 À 10) ET DES BALSACONES A, B, C ET K (25 À 28) DANS LES FRACTIONS A2, C, P1 À P6, LE BRUT D'EXTRACTION ET LE BRUT LAVÉ	49
TABLEAU 4 : ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE (CMI₉₀ ± SD, N = 3) DES EXTRAITS, DE LA BALSACONE C 27 ET DE LA MÉTICILLINE CONTRE <i>S. AUREUS</i> ET <i>E. COLI</i>	62
TABLEAU 5 : ACTIVITÉ (CMI₉₀ ± SD, N = 3) DES EXTRAITS, DE LA BALSACONE C 27 ET DE LA MÉTICILLINE CONTRE DIX SOUCHES DE SARM.....	65
TABLEAU 6 : ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE (CMI₅₀ ± SD, N = 3) DES EXTRAITS ET DE LA BALSACONE C 27 CONTRE LES CELLULES DES FIBROBLASTES HUMAINS NORMAUX (WS-1)	68
TABLEAU 7 : GRADIENT DE SOLVANT UTILISÉ POUR LES ANALYSES CLHP ET CL-SM	72

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE GÉNÉRALE DES BALSACONES ISOLÉES PAR L'ÉQUIPE DU LABORATOIRE LASEVE EN 2012 ⁹	3
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA MÉTICILLINE	9
FIGURE 3 : STRUCTURE GÉNÉRALE DES DHC	10
FIGURE 4 : STRUCTURE DES DHC 1 À 14	11
FIGURE 5 : STRUCTURE DES DHC 15 À 20	12
FIGURE 6 : STRUCTURE DES BALSACONES A 25, B 26 ET C 27	14
FIGURE 7 : STRUCTURE DES COMPOSÉS 28 À 37.....	16
FIGURE 8 : STRUCTURE DES COMPOSÉS 65 ET 66 RETROUVÉ CHEZ <i>I. LAEVIS</i>	24
FIGURE 9 : CHROMATOGRAMMES CLHP DE LA FRACTION RICHE EN DHC A2 (EN HAUT) ET DE LA FRACTION ENRICHIE AVEC 5 %M D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE P1 (EN BAS) À 265 NM	40
FIGURE 10 : MÉTHODE DE PRODUCTION DE L'ASÉBOGÉNINE (DHCA, 8).....	44
FIGURE 11 : TENDANCE DE L'ÉVOLUTION DU SIGNAL DES DHC (8 À 10) ET DES BALSACONES (25 À 28) DANS LES EXTRAITS EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 ENGAGÉ DANS LA RÉACTION.....	48
FIGURE 12 : CONCENTRATION EN DHC (8 À 10) ET EN BALSACONES (25 À 28) DANS LES EXTRAITS EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 ENGAGÉ DANS LA RÉACTION.....	50
FIGURE 13 : ABSORBANCE MOYENNE DES DHC (8 À 10) DANS LES EXTRAITS EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 ENGAGÉ DANS LA RÉACTION.....	50
FIGURE 14 : ABSORBANCE MOYENNE DES BALSACONES (25 À 28) DANS LES EXTRAITS EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 ENGAGÉ DANS LA RÉACTION.....	52
FIGURE 15 : CHROMATOGRAMME CLHP DE L'EXTRAIT TRAITÉ AVEC 20 %M D'ALCOOL (P4) À 265 NM. LES RAPPORTS (M/Z) INDIQUÉES SONT COMMUNS AUX EXTRAITS POTENTIALISÉS (P1 À P6) ET À L'EXTRAIT BRUT LAVÉ.	53
FIGURE 16 : ÉVOLUTION DE L'INTENSITÉ DES SIGNAUX A (M/Z = 551) ET B (M/Z = 521) À 265 NM. LES BARRES D'ERREUR REPRÉSENTENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES	54
FIGURE 17 : STRUCTURE DES COMPOSÉS HYPOTHÉTIQUES 86 ET 87 DONT LA FORMATION EXPLIQUERAIT LA DIMINUTION DES SIGNAUX A ET B DANS LES FRACTIONS P5 ET P6	56
FIGURE 18 : ÉVOLUTION DE L'INTENSITÉ DES SIGNAUX C ET D À 265 NM. LES BARRES D'ERREUR REPRÉSENTENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES.	57
FIGURE 19 : AGRANDISSEMENT DES CHROMATOGRAMMES CLHP DE P4 (EN HAUT) ET DU BRUT D'EXTRACTION LAVÉ (EN BAS) À 265 NM	59
FIGURE 20 : CHROMATOGRAMMES CLHP DE LA FRACTION RICHE EN DHC A2 (EN HAUT) ET DE LA FRACTION ENRICHIE AVEC 35 %M D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE P6 (EN BAS) À 265 NM	60

FIGURE 21 : MODÉLISATION DE LA CMI₉₀ DES EXTRAITS CONTRE <i>S. AUREUS</i> EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 UTILISÉ	63
FIGURE 22 : MOYENNE DES CMI₉₀ DES EXTRAITS (A2 ET P1 À P6) ET DE LA FRACTION C CONTRE <i>S. AUREUS</i>.	63
FIGURE 23 : MODÉLISATION DE LA CMI₉₀ DES EXTRAITS CONTRE LES SARM EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 UTILISÉ	66
FIGURE 24 : MOYENNE DES CMI₉₀ DES EXTRAITS (A2 ET P1 À P6) ET DE LA FRACTION C CONTRE LES SARM.	67
FIGURE 25 : STRUCTURE DE L'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80	76
FIGURE 26 : STRUCTURE DE LA DHCA 8	77
FIGURE 27 : STRUCTURE DE LA DHCB 9	78
FIGURE 28 : STRUCTURE DE LA DHCC 10	78
FIGURE 29 : STRUCTURE DE LA BALSACONE A 25.....	79
FIGURE 30 : STRUCTURE DE LA BALSACONE K 28.....	79
FIGURE 31 : STRUCTURE DE LA BALSACONE B 26.....	80
FIGURE 32 : STRUCTURE DE LA BALSACONE C 27	81
FIGURE 33 : SPECTRE RMN ¹H DE L'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 (400 MHZ, MEOD)	91
FIGURE 34 : SPECTRE RMN ¹³C DE L'ALCOOL 4-HYDROXYCINNAMIQUE 80 (100 MHZ, MEOD)	92
FIGURE 35 : SPECTRE RMN ¹H DU 4,2',6'-TRIHYDROXY-4'-METHOXYDIHYDROCHALCONE 8 (400 MHZ, MEOD)	93
FIGURE 36 : SPECTRE RMN ¹³C DU 4,2',6'-TRIHYDROXY-4'-METHOXYDIHYDROCHALCONE 8 (100 MHZ, MEOD)	94
FIGURE 37 : SPECTRE RMN ¹H DU 2',4',6'-TRIHYDROXY-4-METHOXYDIHYDROCHALCONE 9 (500 MHZ, MEOD)	95
FIGURE 38 : SPECTRE RMN ¹³C DU 2',4',6'-TRIHYDROXY-4-METHOXYDIHYDROCHALCONE 9 (126 MHZ, MEOD)	96
FIGURE 39 : SPECTRE RMN ¹H DU 2',4',6'-TRIHYDROXYDIHYDROCHALCONE 10 (400 MHZ, MEOD)	97
FIGURE 40 : SPECTRE RMN ¹³C DU 2',4',6'-TRIHYDROXYDIHYDROCHALCONE 10 (100 MHZ, MEOD)	98
FIGURE 41 : SPECTRE RMN ¹H DE LA BALSACONE A 25 (500 MHZ, (CD₃)₂CO)..	99
FIGURE 42 : SPECTRE RMN ¹³C DE LA BALSACONE A 25 (126 MHZ, (CD₃)₂CO)	100
FIGURE 43 : SPECTRE RMN ¹H DE LA BALSACONE B 26 (500 MHZ, MEOH)	101
FIGURE 44 : SPECTRE RMN ¹³C DE LA BALSACONE B 26 (126 MHZ, MEOH) ...	102
FIGURE 45 : SPECTRE RMN ¹H DE LA BALSACONE C 27 (500 MHZ, (CD₃)₂CO)	103
FIGURE 46 : SPECTRE RMN ¹³C DE LA BALSACONE C 27 (126 MHZ, (CD₃)₂CO)	104
FIGURE 47 : SPECTRE RMN ¹H DE LA BALSACONE K 28 (500 MHZ, (CD₃)₂CO)	105
FIGURE 48 : SPECTRE RMN ¹³C DE LA BALSACONE K 28 (126 MHZ, (CD₃)₂CO)	106
FIGURE 49 : SPECTRE RMN ¹H DE LA BALSACONE J 30 (500 MHZ, (CD₃)₂CO).	107
FIGURE 50 : SPECTRE RMN ¹³C DE LA BALSACONE J 30 (126 MHZ, (CD₃)₂CO)	108

FIGURE 51 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA DHCA 8 À 284 NM	109
FIGURE 52 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA DHCB 9 À 284 NM	109
FIGURE 53 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA DHCC 10 À 284 NM	110
FIGURE 54 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA BALSACONE A 25 À 265 NM....	110
FIGURE 55 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA BALSACONE B 26 À 265 NM....	111
FIGURE 56 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA BALSACONE C 27 À 265 NM....	111
FIGURE 57 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE LA BALSACONE K 28 À 265 NM....	112
FIGURE 58 : CHROMATOGRAMMES CLHP DES FRACTIONS A2 (EN HAUT) ET P1 (EN BAS) À 265 NM.....	113
FIGURE 59 : CHROMATOGRAMMES CLHP DES FRACTIONS P2 (EN HAUT) ET P3 (EN BAS) À 265 NM.....	114
FIGURE 60 : CHROMATOGRAMMES CLHP DES FRACTIONS P4 (EN HAUT) ET P5 (EN BAS) À 265 NM.....	115
FIGURE 61 : CHROMATOGRAMMES CLHP DE LA FRACTION P6 (EN HAUT) ET DU BRUT D'EXTRACTION (EN BAS) À 265 NM.....	116
FIGURE 62 : CHROMATOGRAMMES CLHP DU BRUT D'EXTRACTION LAVÉ (EN HAUT) ET DE LA FRACTION C (EN BAS) À 265 NM	117
FIGURE 63 : SPECTRES D'ABSORPTION DES DHC 8 À 10 , DES BALSACONES 25 À 28 ET DES SIGNAUX DES COMPOSÉS A À G DE 200 À 400 NM.....	118

LISTE DES SCHEMAS

SCHÉMA 1 : MÉCANISME INSPIRÉ DE TOOKE <i>ET AL.</i> ³⁰ POUR L'HYDROLYSE DES B-LACTAMINES PAR LES B-LACTAMASES DE TYPE SÉRINE HYDROLASE (CLASSES A, C ET D).....	7
SCHÉMA 2 : MÉTHODE DE PRODUCTION DE L'HESPÉRÉTINE DHC 23 À PARTIR DE LA NÉOHESPÉRIDINE 21.....	13
SCHÉMA 3 : SYNTHÈSE TOTALE DES DHC 8 À 10.....	18
SCHÉMA 4 : SYNTHÈSE TOTALE ALTERNATIVE DE DHC.....	19
SCHÉMA 5 : SYNTHÈSE TOTALE D'UN PRÉCURSEUR DE LA BALSACONE A...20	20
SCHÉMA 6 : SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 58.....	21
SCHÉMA 7 : SYNTHÈSE TOTALE DES BALSACONES B (26) ET C (27).....	22
SCHÉMA 8 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 63 ET 64 RETROUVÉS CHEZ <i>DALBERGIA</i>.....	23
SCHÉMA 9 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 68 À 70.....	25
SCHÉMA 10 : MÉCANISME DE LA MÉTHODE D'ALKYLATION DÉVELOPPÉE PAR FRIEDEL ET CRAFTS.....	26
SCHÉMA 11 : ALKYLATION DE FC ENTRE LE 1-PENTÈN-3-OL 75 ET LE BENZÈNE 72 POUR FORMER LE PENT-2-ENYLBENZÈNE 76.....	27
SCHÉMA 12 : ALKYLATION DE FC ENTRE L'ALCOOL ALLYLIQUE 77 OU L'ALCOOL CINNAMIQUE 62 ET LE PHÉNOL 78 POUR FORMER LE COMPOSÉ 79.....	28
SCHÉMA 13 : MÉCANISME DE L'HÉMISYNTHESE DES BALSACONES 25 À 27.....	29
SCHÉMA 14 : MÉCANISME DE LA SYNTHÈSE DE LA BALSACONE K 28.....	31
SCHÉMA 15 : MÉCANISME DE LA FORMATION DE LA BALSACONE F 81.....	32
SCHÉMA 16 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 83 À 85.....	33
SCHÉMA 17 : PRINCIPE DU TRAVAIL DE MAÎTRISE.....	35
SCHÉMA 18 : MÉTHODE D'HÉMISYNTHESE <i>IN SITU</i>.....	38
SCHÉMA 19 : SCHÉMA DE SYNTHÈSE DE LA DHCB 9 ET DE LA DHCC 10.....	43
SCHÉMA 20 : SCHÉMA DE SYNTHÈSE DES BALSACONES A, B ET C (25 À 27).....	46
SCHÉMA 21 : FORMATION DES COMPOSÉS 31 ET 32 (BALSACONE P).....	55
SCHÉMA 22 : SCHÉMA DE FRACTIONNEMENT DES BOURGEONS DE <i>P. BALSAMIFERA</i>.....	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Δ	Chauffage
λ	Longueur d'onde
%m	Pourcentage massique
% mol	Pourcentage molaire
%v	Pourcentage volumique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ACS	<i>American Chemical Society</i>
ANOVA	Analyse de variance
APTS	Acide 4-toluènesulfonique
Ar	Groupe aryl
Bn	Groupe benzyle
br	<i>Broad</i> (large)
CCM	Chromatographie sur couche mince
CAM	Ceric ammonium molybdate
CMI₉₀	Concentration minimale inhibitrice d'un pourcentage défini (ici, 90%)
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CL-SM	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
d	Doublet
DCM	Dichlorométhane
DHC	Dihydrochalcone
DHCa	Dihydrochalcone précurseur d'une balsacone (ici, de la balsacone A)
DIBAL-H	Hydruide de diisobutylaluminium
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EOM	Groupe éther éthoxyméthyle
FC	Friedel-Crafts
J	Constante de couplage
m	Multiplet
M	Molaire
MOM	Groupe éther méthoxyméthyle
MOMCl	Chlorométhoxyméthane
ON	<i>Overnight</i> (pendant la nuit)
PLP	Protéines de liaison aux pénicillines
RAM	Résistance aux antimicrobiens
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
Ser	Sérine
SM	Spectromètre de masse
t	Triplet
TA	Température ambiante

TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	Groupe <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TEA	Triéthylamine
TFBA	Acide (2,3,4,5-tétrafluorophényl)boronique
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane
tr	Temps de rétention
Ts	Groupe tosyle
UV	Ultraviolet
UV-DAD	<i>Ultraviolet Diode Array Detector</i>
VM	Volume mort

REMERCIEMENTS

Je souhaite d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Jérôme Alsarraf, autant pour son humour que pour sa pédagogie efficace à laquelle ce dernier participe. Ces deux années de maîtrise ont été une grande source d'épanouissement grâce à sa transmission de savoir, son attention, son support et ses calembours. Je souhaite également remercier mes codirecteurs de recherche, les professeurs André Pichette et Jean Legault pour l'opportunité d'avoir pu réaliser cette maîtrise dans des conditions optimales. Merci également à Catherine Dussault et Karl Girard-Lalancette pour la réalisation des tests antibactériens sur *S. aureus*, le SARM et *E. coli* et leur aide sur l'analyse des résultats. Je remercie aussi Sergio Rossi de m'avoir aidé avec les analyses statistiques.

Je tiens également à remercier en particulier Josianne Savard et Balla Sylla pour leur aide précieuse au laboratoire et avec qui travailler a été un plaisir, autant grâce à leur bonne humeur qu'à leurs multiples compétences.

Je remercie également les stagiaires Céline Farinas et Marie-Lee Audet qui ont travaillé avec moi sur différentes parties du mon projet et avec qui j'ai pu chercher à optimiser certaines étapes de la production de dihydrochalcones et de balsacones.

Un grand merci à mes deux collègues et amis Dominique Grenier-Pimparé et Vincent Maltais Bourgeois avec qui je partage une passion commune qui renouvelle sans cesse notre intérêt pour la chimie et pour le savoir divin.

Enfin, un merci tout particulier à ma sœur, Sophie, ne serait-ce que pour sa présence et son amour et sans qui tout ça n'aurait pas été possible, ainsi qu'au reste de ma chère famille. Il en va de même pour Sylvian et mon autre Sophie qu'aucun océan n'arrive à éloigner de mon cœur.

INTRODUCTION

De multiples traitements traditionnels sont utilisés depuis des millénaires par différentes civilisations pour lutter contre les infections causées par les micro-organismes pathogènes. Ces traitements ont souvent de réelles propriétés antibiotiques et comprennent, par exemple, des plantes, du miel ou même des moisissures ^{1, 2}. D'antan, les infections causées par certains micro-organismes étaient cependant particulièrement meurtrières (e.g. la peste, *Yersinia pestis*) en raison du manque de connaissances sur ces derniers et sur le lien entre eux et l'hôte infecté ³.

Aux 17^{ème} et 18^{ème} siècles, des avancées majeures des connaissances en microbiologie ont lieu, notamment avec les travaux d'Antoni van Leeuwenhoek sur les analyses d'organismes microscopiques. Au 19^{ème} siècle, les travaux de Robert Koch et de Louis Pasteur permettent d'établir la relation entre les bactéries et les infections propagées par ces dernières ^{1, 3}. Le début du siècle suivant voit le développement des premiers agents antibactériens (Salvarsan et Neosalvarsan) avec les travaux de Paul Ehrlich sur la syphilis (*Treponema pallidum*). Ces composés synthétiques constitués d'atomes d'arsenic rendent les traitements dangereux en terme d'effets secondaires ^{2, 3}. Vient ensuite la découverte de l'activité antibactérienne à large spectre du sulfonamide Prontosil par Gerhard Domagk en 1935 et qui donne lieu aux premiers cas de résistance aux antimicrobiens (RAM), peu de temps après sa mise sur le marché ².

Durant la même période, les travaux de Fleming en 1928 sur la pénicilline et la mise sur le marché de cette dernière au milieu des années 1940 symbolisent le début de l'âge d'or

des agents antibiotiques. D'importantes recherches subséquentes découlent des travaux sur la pénicilline, le Salvarsan et le Prontosil ^{1,2}. Entre les années 1950 et 1970, s'en suivirent la découverte d'autres familles d'antibiotiques encore utilisées aujourd'hui comme les aminosides, les glycopeptides, les macrolides, les tétracyclines, les quinolones ou encore d'autres composés de la famille des pénicillines (β -lactamines) ³. En parallèle, depuis cette même période et suite au large déploiement de ces agents antibiotiques, le phénomène de RAM a rapidement évolué, notamment avec l'émergence et la propagation de bactéries multirésistantes comme les souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ¹⁻⁴.

Aujourd'hui, bien que les enjeux causés par la RAM soient majeurs ⁵ et que les efforts investis dans la recherche de nouvelles classes d'agents antimicrobiens pour répondre à ces enjeux soient insuffisants ³, les pistes pour lutter contre la RAM sont nombreuses, aussi bien sur le plan de la recherche scientifique que sur le plan de la politique sanitaire ^{3,6}. Une de ces pistes est de continuer la recherche et le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes, soit par pharmaco-modulation, soit par le criblage de composés d'origine naturelle ².

Dans cette optique de découverte de nouveaux composés antimicrobiens, l'équipe du laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC) a analysé la composition chimique des bourgeons de *Populus balsamifera* L. (peuplier baumier), un feuillu commun en Amérique du Nord ⁷, en s'appuyant sur leur utilisation traditionnelle par les Premiers Peuples pour le traitement des plaies ⁸. Trois molécules, jusque-là inconnues, ont été identifiées et ont montré des

propriétés antibactériennes intéressantes contre *S. aureus* avec des concentrations inhibitrices minimales (CMI₉₀) allant de 1,2 à 2,6 µg/mL⁹. L'une d'entre elles possède également une activité intéressante contre le SARM avec une CMI₉₀ de 2,0 µg/mL¹⁰. Ces molécules, nommées « balsacones » sont des dihydrochalcones (DHC) cinnamylées dont la structure est représentée à la **Figure 1**. Par la suite, plusieurs autres balsacones minoritaires plus complexes et comportant une ou plusieurs unités 4-hydroxycinnamyle, cyclisées ou non, ont été identifiées à partir d'extraits de ces mêmes bourgeons. Plusieurs d'entre elles présentent aussi des activités antibactériennes intéressantes contre *S. aureus* et le SARM¹⁰⁻¹².

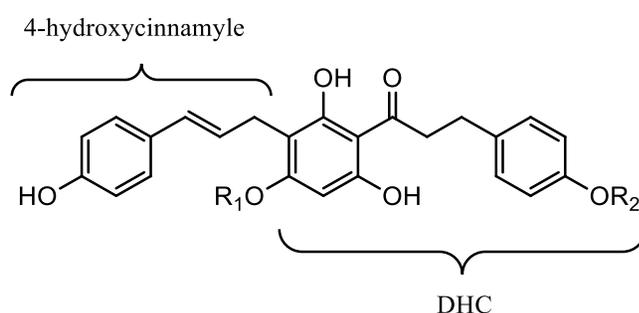


Figure 1 : Structure générale des balsacones isolées par l'équipe du laboratoire LASEVE en 2012⁹

Néanmoins, bien que l'activité antibactérienne des balsacones soit intéressante, leur isolation à partir des extraits de bourgeons de *P. balsamifera* est fastidieuse et les rendements sont relativement faibles⁹. Par ailleurs, la synthèse totale de balsacones ne semble pas être une alternative satisfaisante étant donné qu'elle requiert de nombreuses étapes et l'utilisation de composés toxiques, en plus d'offrir un rendement global plutôt faible^{13,14}.

En réponse à cet enjeu et en s'inspirant d'une voie de biosynthèse plausible^{15, 16}, une méthode d'hémisynthèse a récemment été mise au point en utilisant les DHC précurseurs des balsacones également contenues dans les bourgeons de *P. balsamifera* et présentes en plus grande quantité¹⁷. Cependant, le défi d'isolation de certains précurseurs (DHC) pour la synthèse de balsacones est important¹⁸. La recherche d'une autre voie de production de balsacones antibactériennes qui contournerait les défis posés par celles déjà existantes, tout en conservant les principes de chimie verte et d'hémisynthèse en une étape, est donc souhaitable.

Dans ce contexte, l'objectif des présents travaux est de réaliser l'hémisynthèse des balsacones directement dans des extraits naturels riches en DHC. Les balsacones produites dans les extraits seront quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Le caractère biomimétique de l'approche hémisynthétique sera discuté et l'impact de l'hémisynthèse *in situ* sur les propriétés antibactériennes des extraits sera mesuré *in vitro*.

Le présent travail de maîtrise est divisé en quatre chapitres. Une revue de littérature est suivie de la présentation et de la discussion des résultats obtenus, puis d'une conclusion ouverte sur les perspectives possibles du projet. Le document est terminé par une partie expérimentale détaillant les protocoles utilisés lors des manipulations et des analyses.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Phénomène de résistance aux agents antimicrobiens

1.1.1 Considérations générales

Le phénomène de résistance aux antimicrobiens (RAM) se traduit par l'acquisition de mécanismes de résistance chez une population de micro-organismes, ce qui rend les agents antibiotiques inefficaces pour traiter les infections liées à ceux-ci ^{5, 19}. Les cas de RAM deviennent répandus dès les années 1940, peu de temps après l'introduction des molécules antibiotiques dans les méthodes de traitements d'infections bactériennes communes (**Tableau 1**), ce qui témoigne de l'évolution extrêmement rapide de ce phénomène ²⁰.

Tableau 1 : Date de mise sur le marché et d'apparition de résistances face aux antibiotiques (inspiré de Palumbi ²¹)

Antibiotique	Date de mise sur le marché	Observation de résistance
Sulfonamides	1930s	1940s
Penicilline	1943	1946
Streptomycine	1943	1959
Chloramphenicol	1947	1959
Tetracycline	1948	1953
Erythromycine	1952	1988
Vancomycine	1956	1988
Méticilline	1960	1961
Ampicilline	1961	1973
Cephalosporines	1960s	fin 1960s

Les causes d'apparition et du développement de la RAM sont multiples ⁵ mais un facteur majeur de ce phénomène est l'utilisation répétée et mal contrôlée des antibiotiques ^{3, 5, 22, 23}, autant chez les populations humaines qu'animales ^{22, 24}. Les pays en voie de développement sont davantage touchés par les cas de RAM malgré une utilisation moins importante d'antibiotiques que dans les pays riches, notamment en raison de systèmes sanitaires insuffisamment développés et d'utilisations de traitements inappropriés ²⁴. Seulement en 2019, à l'échelle internationale, 1,27 millions de morts sont directement attribuables à la RAM de 88 pathogènes (association pathogène-traitement). Six de ces pathogènes sont à eux seuls responsables de 929 000 de ces morts (73 %) ¹⁹.

L'acquisition de mécanismes de résistance chez les bactéries par le biais d'un ADN mutant peut se produire par transfert vertical, à la progéniture, ou par transfert horizontal, entre différents individus ⁴. La majorité des mécanismes de résistance sont acquis par transfert horizontal de gènes, souvent entre des espèces différentes de bactéries ²⁵. Dans certains cas, les mécanismes de défense développés par les bactéries peuvent se révéler efficaces, non seulement contre une molécule en particulier, mais également contre d'autres molécules faisant partie de la même classe d'antibiotiques, ce qui donne lieu à des phénomènes de multirésistance. Notamment, les bactéries produisant des enzymes β -lactamases ont la capacité de résister à plusieurs molécules antibiotiques faisant partie de la famille des β -lactamines en hydrolysant la liaison amide du cycle (**Schéma 1**) ²⁶⁻²⁸. Par exemple, la β -lactamase PC-1 du *S. aureus* résistant à la pénicilline hydrolyse aussi bien la pénicilline G que l'ampicilline ²⁹ et la β -lactamase TEM présente chez certaines bactéries à Gram négatif hydrolyse les aminopénicillines comme l'ampicilline et l'amoxicilline ³⁰. Plus largement, certaines bactéries ont aussi développé la capacité de résister à plusieurs classes

d'antibiotiques différentes ^{5, 19}. Les mécanismes de résistance des bactéries sont nombreux et comprennent par exemple : la limitation de l'absorption des molécules antibiotiques (modification des porines, formation d'un biofilm protecteur), le rejet des molécules antibiotiques par des pompes d'efflux, la modification de la cible de ces molécules, et des mécanismes affectant les molécules antibiotiques en elles-mêmes (inactivation par modification ou par destruction) ^{2, 3}.

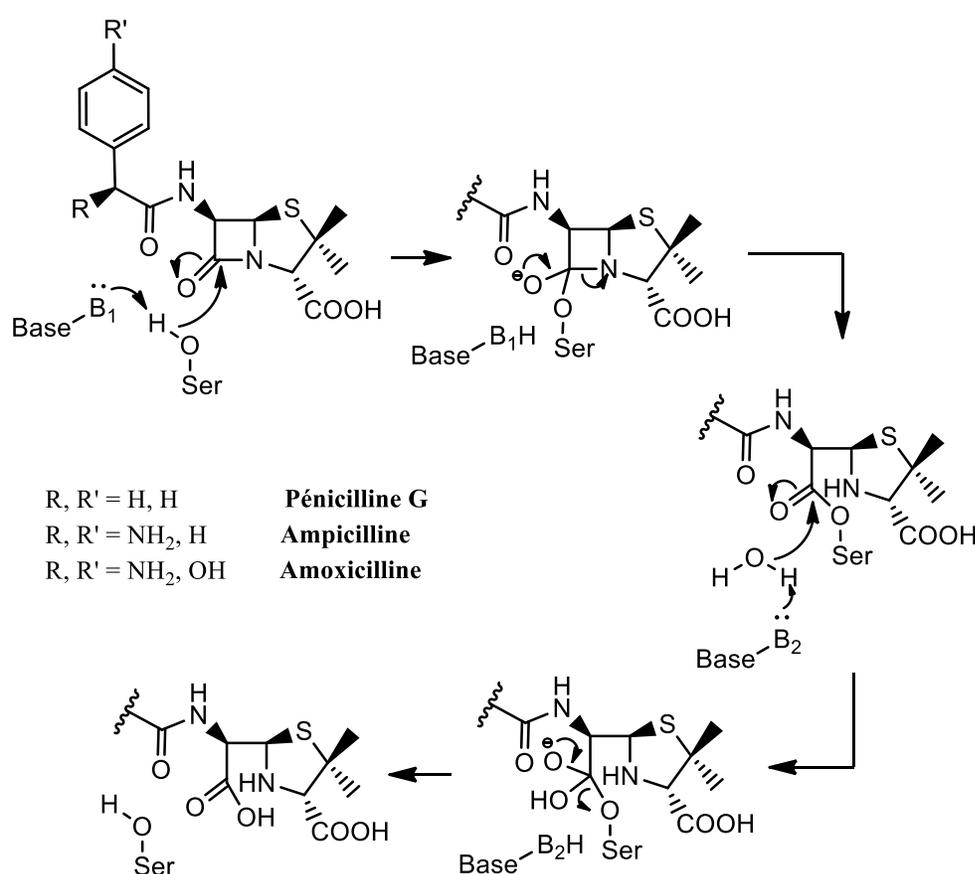


Schéma 1 : Mécanisme inspiré de Tooke *et al.* ³⁰ pour l'hydrolyse des β-lactamines par les β-lactamases de type sérine hydrolase (classes A, C et D)

Il est estimé que les infections liées à des cas de RAM doublent la durée de l'hospitalisation ainsi que le taux de mortalité comparativement aux infections sensibles

aux antibiotiques ³¹. Malgré la difficulté à quantifier l'impact économique engendré par la RAM, il est estimé que ce phénomène engendrerait un coût supplémentaire allant de 13 à 21 milliards de dollars du produit intérieur brut (PIB) canadien par an d'ici 2050 ³².

1.1.2 *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

S. aureus est une bactérie à Gram positif qui peut être responsable d'infections cutanées ou, dans les cas les plus graves, qui peut mener à des pneumonies, à des infections osseuses ou, plus largement, à des septicémies ^{33,34}. *S. aureus* est également responsable de la majorité des infections de la peau et des tissus mous contractées en milieu hospitalier ³⁵. Chez l'humain, *S. aureus* se retrouve principalement au niveau des narines et colonise de manière permanente environ 20 % des individus. Cependant, les individus non-porteurs touchés par une bactériémie exogène ont un taux de mortalité quatre fois plus élevés que les individus ayant un portage nasal ³⁶. Les infections liées aux souches de *S. aureus* susceptibles aux pénicillines étaient auparavant traitées avec la pénicilline G puis avec d'autres pénicillines hémissynthétiques comme la méticilline puis les oxacillines ³⁷. Toutes ces molécules appartiennent à la famille de β -lactamines qui ont le même mode d'action sur *S. aureus*. Grâce à leur ressemblance avec un pentapeptide utilisé pour la synthèse de la paroi cellulaire, les β -lactamines se lient aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) qui sont impliquées dans cette synthèse. Elles inhibent la transpeptidation nécessaire à l'intégrité structurelle de la paroi en provoquant une acylation irréversible des PLP ^{30,38,39}.

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) représente les souches de *S. aureus* ayant développé un mécanisme de résistance face à la méticilline (**Figure 2**).

Cette dernière est une pénicilline hémisynthétique développée en 1959 en réponse à la résistance de *S. aureus* à la pénicilline G par la production de pénicillinases (β -lactamase). Le groupe diméthoxyphényle de la méticilline offre une faible affinité envers les pénicillinases en raison de l'encombrement stérique qu'il provoque au niveau du site enzymatique où se produit normalement l'hydrolyse ³⁸. Face à l'émergence de cet antibiotique, les souches de *S. aureus* ont développé un autre mécanisme de résistance principalement grâce à des transferts horizontaux du gène *mecA* qui code pour l'enzyme PLP2a, une version modifiée des enzymes PLP qui a une moindre affinité pour les pénicillines et la plupart des β -lactamines ^{29, 30, 38-40}. Le SARM est aussi souvent résistant à d'autres classes d'antibiotiques en plus d'une part importante des β -lactamines, comme les tétracyclines, les aminoglycosides ou les lincosamides ⁴¹.

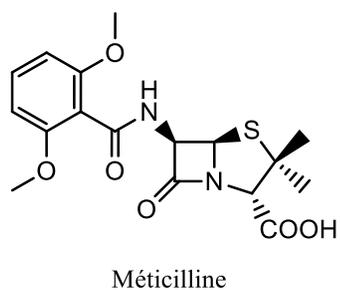


Figure 2 : Structure de la méticilline

Parmi les six pathogènes responsables de 73 % des décès directement attribuables à la RAM à l'échelle mondiale, le SARM est le troisième plus important, après *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, causant 160 000 morts sur 929 000 (17 %) en 2019 ¹⁹.

Pour répondre aux infections causées par le SARM, plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés selon la sensibilité des bactéries comme, par exemple, la vancomycine, la daptomycine, la céftaroline et certaines molécules antibiotiques de la famille des oxazolidinones³³. Cependant, plusieurs cas de résistance à la vancomycine^{42, 43}, à la daptomycine^{44, 45} et à la céftaroline⁴⁶ ont déjà été rapportés.

1.2 Dihydrochalcones et balsacones

1.2.1 Généralités sur les dihydrochalcones

Les dihydrochalcones (DHC), illustrées à la **Figure 3**, font partie de la sous-classe chalcone des flavonoïdes et, bien que ces derniers dans leur ensemble soient en général largement répandus à travers les végétaux, les DHC sont moins abondantes⁴⁷. La structure des DHC diffère des chalcones simplement par l'absence de liaison α,β -insaturée⁴⁸. Les chalcones sont souvent substituées sur les positions C-2', C-4' et C-6' (noyau A) alors que le noyau B est souvent monosubstitué ou non substitué⁴⁹.

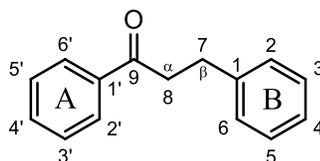


Figure 3 : Structure générale des DHC

Les DHC sont souvent naturellement retrouvées sous forme de *O*-glycosides. Notamment, la phloridzine **1** et sa génine, la phlorétine **2**, sont présentes en grande quantité

dans les feuilles et les pépins chez le genre *Malus* (pommiers) ^{50, 51}. Par ailleurs, la phloridzine **1** est également retrouvée dans *Kalmia latifolia* L. et *Pieris japonica* Thunb. ⁵². D'autres glucosides de DHC comme la trilobatine **3**, la confusoside **4**, la vacciniifoline **5** et la sieboldine **6** sont retrouvées dans *Symplocos vacciniifolia* H.S. Chen & H.G. Ye ⁵³. L'asébotine **7** est présente chez *P. japonica*, *Kalmia angustifolia* L. ⁵² et chez certaines espèces de *Rhododendron* ⁵⁴. L'asébogénine **8** est également présente chez ces mêmes espèces de *Rhododendron* ⁵⁴ ainsi que chez *Populus balsamifera* L. (peuplier baumier) qui contient également quatre autres DHC non glycosylées **9** à **12** ⁹. Une autre DHC non glycosylée **13** est présente dans *Iryanthera laevis* Markgr., *Iryanthera paraensis* Huber et *Iryanthera ulei* Warb. ¹⁶ et la DHC **14** est également présente dans cette dernière espèce ⁵⁵ (**Figure 4**).

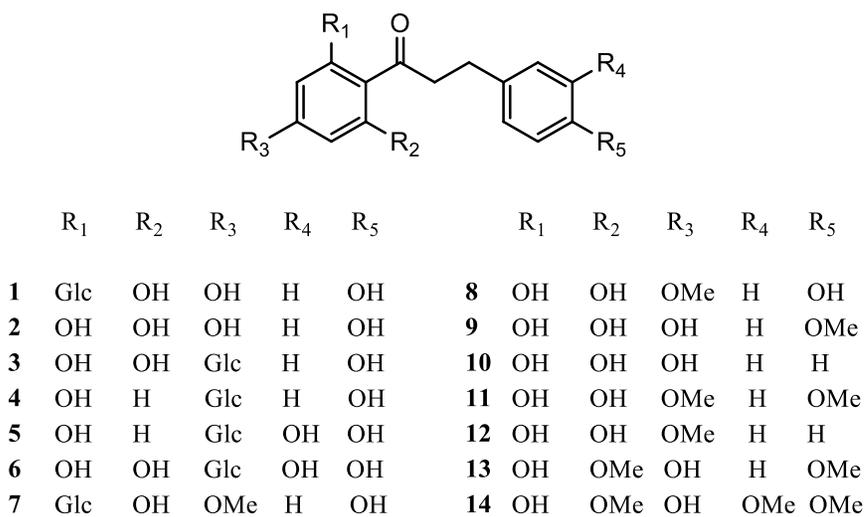


Figure 4 : Structure des DHC **1** à **14**

Certaines DHC peuvent aussi être C-glycosylées comme l'aspalathine **15** et la nothofagine **16** retrouvées chez *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R.Dahlgren (rooibos) ⁵⁶;

benzylées comme l'uvarétine **17** retrouvée chez *Uvaria acuminata* Oliv.⁵⁷; prénylées comme les erioschalcones A **18** et B **19** retrouvées chez *Eriosema glomerata* Guill. & Perr.; ou encore géranylées comme la DHC **20** retrouvée chez *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg⁵⁸ (**Figure 5**).

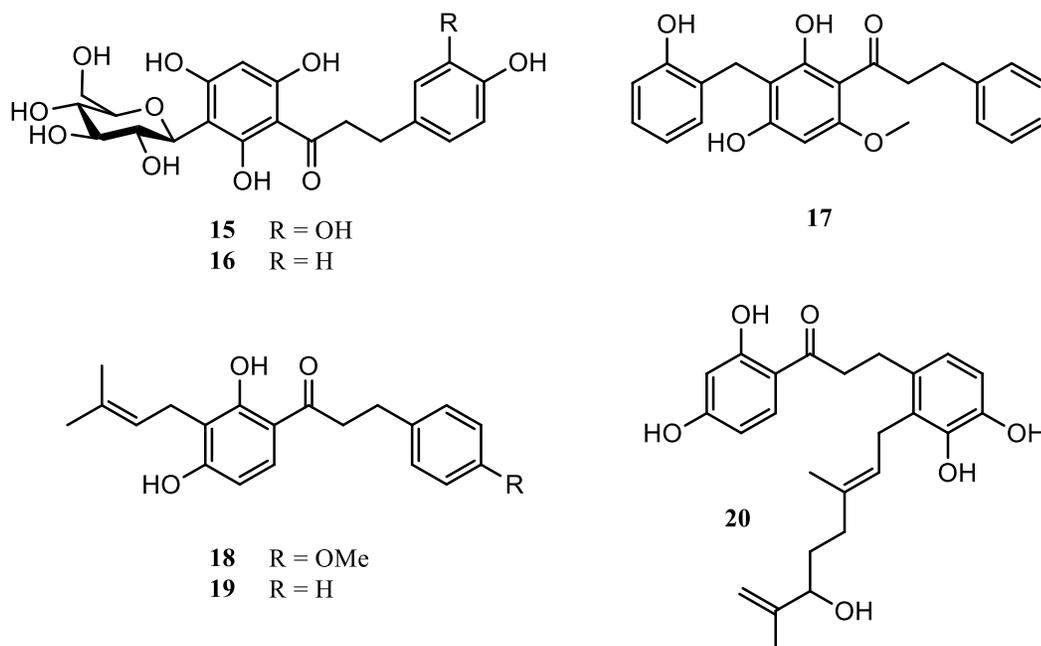


Figure 5 : Structure des DHC **15** à **20**

Les DHC peuvent être produites par hémisynthèse à partir des flavones ou des flavanones correspondantes ou même à partir de leurs glycosides. Par exemple, la génine de la néohespéridine **21**, un glycoside de flavanone communément retrouvé chez plusieurs espèces de *Citrus* (agrumes)⁵⁹, peut être obtenue par hydrolyse acide. Suite à l'obtention de l'hespéretine **22**, la DHC correspondante, l'hespéretine dihydrochalcone **23**, peut être obtenue par hydrogénation catalytique classique ou par hydrogénation par transfert⁶⁰. La néohespéridine dihydrochalcone **24** peut être obtenue en faisant seulement une

hydrogénation de la néohespéridine **21** (Schéma 2), ce glycoside de DHC étant utilisé dans l'industrie alimentaire comme édulcorant^{61, 62}. De la même manière, une flavone telle que la chryisine peut être réduite par hydrogénation catalytique jusqu'à obtenir la DHC **10**⁶³.

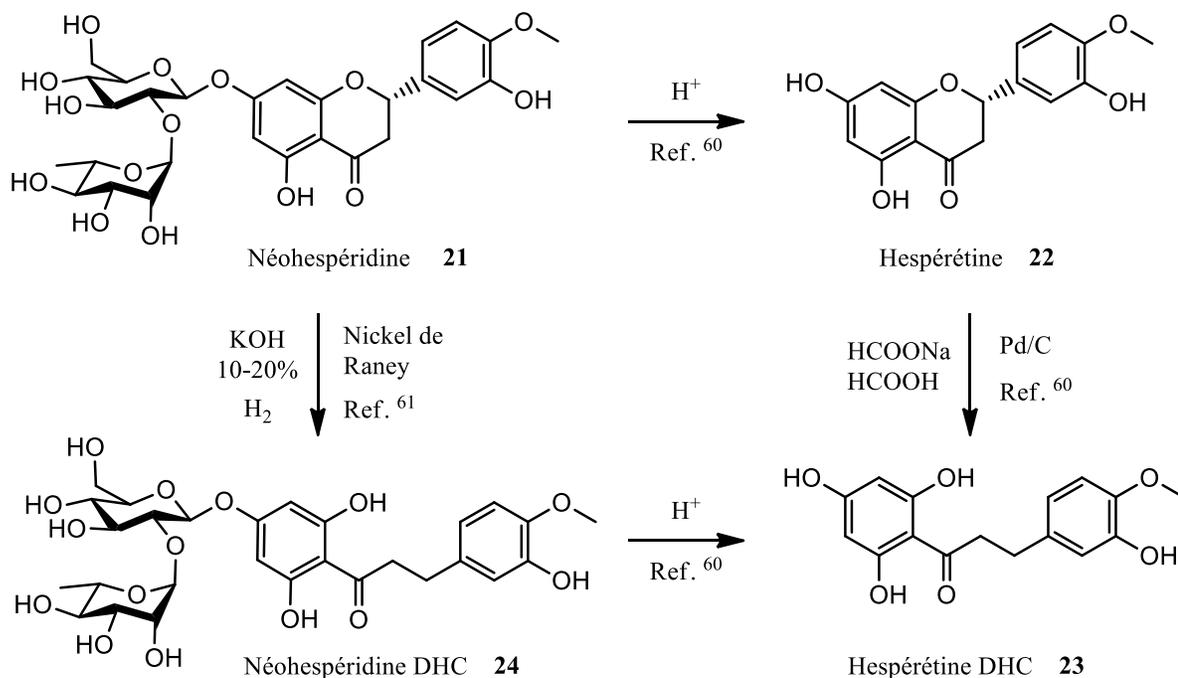


Schéma 2 : Méthode de production de l'hespéretine DHC **23** à partir de la néohespéridine **21**

Les DHC ont généralement de multiples activités biologiques, notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, cytotoxiques et antispasmodiques et certaines sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés édulcorantes

⁶⁴.

1.2.2 Généralités sur les balsacones

Les balsacones sont des DHC substituées par une ou plusieurs unités 4-hydroxycinnamyle (**Figure 6**)^{9, 10}. Les balsacones ont été découvertes dans les bourgeons de peuplier baumier (*P. balsamifera*)⁹ bien que l'existence de la balsacone B **26** avait été supposée dès 1990 dans *I. laevis*, *I. paraensis* et/ou *I. ulei* et que la présence d'analogues y ait été observée⁵⁵. Le peuplier baumier est un arbre de la famille des *Salicaceae* répandu à travers la forêt boréale du Canada et au nord des États-Unis d'Amérique^{7, 65} et ses bourgeons étaient traditionnellement utilisés par les Premières Nations (e.g., Malecites, Micmacs, Ojibwés, Menominee) pour le traitement des plaies et pour certaines affections de la peau comme l'eczéma⁸. La propolis fabriquée avec l'exsudat de bourgeons de peuplier baumier⁶⁶ pourrait également contenir des balsacones.

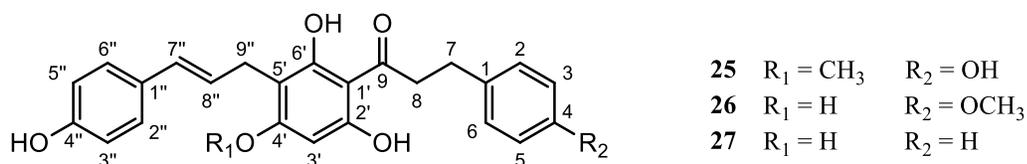
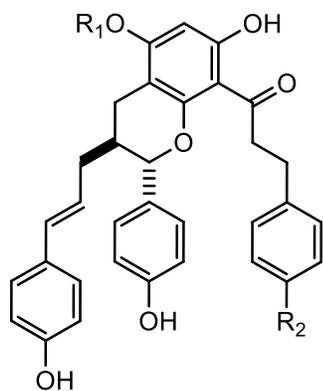


Figure 6 : Structure des balsacones A **25**, B **26** et C **27**

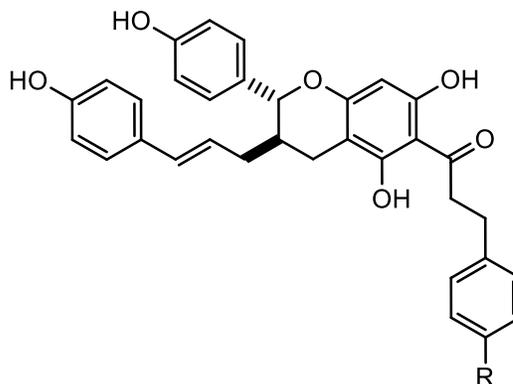
Les balsacones A **25**, B **26** et C **27** présentent des activités intéressantes contre *S. aureus* (respectivement, CMI₉₀ = 2,6 µg/mL ; 2,6 µg/mL ; 1,2 µg/mL)⁹. La balsacone C **27** a aussi une activité intéressante contre le SARM avec une CMI₉₀ de 2,0 µg/mL¹⁰. Cette dernière ne semble pas induire de résistance chez les populations de *S. aureus* et de SARM traitées. De plus, elle n'est pas cytotoxique pour les cellules saines humaines WS1 aux concentrations actives contre les bactéries⁶⁷. D'autre part, certaines balsacones présentent

des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes qui les rendent intéressantes dans le cadre de traitements contre certaines dermatites, notamment contre le psoriasis ⁶⁸.

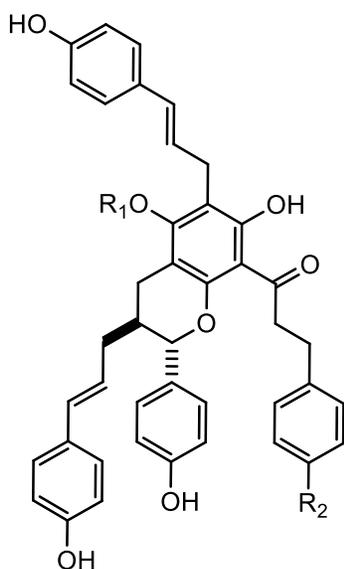
Certaines balsacones sont constituées de plusieurs unités 4-hydroxycinnamyle dont certaines sont cyclisées (**Figure 7**). Par exemple, la balsacone K **28** ¹⁰, l'iryrantherin-D **29**, qui a déjà été isolée à partir de *I. laevis* et *I. ulei* ¹⁶, et la balsacone J **30** ¹⁰ sont constituées de deux unités 4-hydroxycinnamyle cyclisées en position ortho (C-2' ou C-6'). Ces trois balsacones sont respectivement issues de la DHCa **8**, de la DHCb **9** et de la DHCc **10**. De la même manière, la balsacone P **32** ¹⁰, issue de la DHCc **10**, est doublement cinnamylée et cyclisée en position para (C-4'). Le dérivé **31** qui serait issu de la double cinnamylation-cyclisation en position para sur la DHCb **9** semble cependant ne pas avoir été rapporté dans la littérature. Également, la balsacone Q **34** issue de la DHCb **9** est le seul cas de triple cinnamylation-cyclisation rapporté par Simard *et al.* ¹⁰, les deux autres dérivés analogues **33** et **35** n'y figurant pas. Enfin, les balsacones U **36** et T **37** qui résultent d'une quadruple cinnamylation-cyclisation en position ortho (C-2' ou C-6') et para (C-4') respectivement sur la DHCb **9** et la DHCc **10** sont aussi rapportés par Simard *et al.* ¹⁰, bien qu'aucun cas de cyclisation sur les deux positions ortho (C-2' et C-6') ne soit documenté ¹⁰.



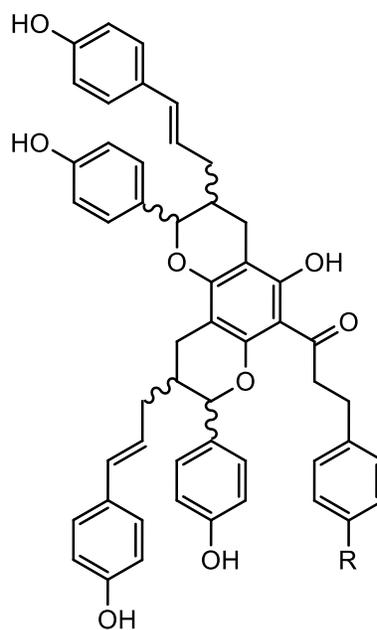
- 28** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{OH}$ **Balsacone K**
29 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OCH}_3$ **Iryantherin-D**
30 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ **Balsacone J**



- 31** $R = \text{OCH}_3$
32 $R = \text{H}$ **Balsacone P**



- 33** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{OH}$
34 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OCH}_3$ **Balsacone Q**
35 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$



- 36a et 36b** $R = \text{OCH}_3$ **Balsacones U1 et U2**
37a et 37b $R = \text{H}$ **Balsacones T1 et T2**

Figure 7 : Structure des composés **28** à **37**

1.2.3 Enjeux de production des balsacones

L'exsudat des bourgeons du peuplier baumier contenant les balsacones est une matrice complexe et l'isolation de ces dernières nécessite donc un procédé fastidieux passant par plusieurs étapes de chromatographie sur colonne et par CLHP préparative⁹. Par ailleurs, les balsacones A, B et C **25** à **27** n'ont été isolées que dans de faibles quantités, respectivement 22 mg, 34 mg et 18 mg pour 875 g de bourgeons⁹, ce qui pose un enjeu quant à la rentabilité de la production de ces balsacones naturelles par des approches de purification classiques.

Le moyen le plus évident pour contourner les faibles rendements d'isolation de composés d'intérêt est de mettre au point une synthèse totale. La voie de synthèse la plus commune des DHC précurseurs des balsacones est de passer par une condensation de Claisen-Schmidt entre un dérivé d'acétophénone **40**, **41**, produit à partir du phloroglucinol **38** ou de son dérivé monométhylé **39**, et un dérivé de benzaldéhyde protégé^{13, 14, 69-72}. La DHC correspondante est ensuite produite après hydrogénation et déprotection de la chalcone (**Schéma 3**)^{13, 72}.

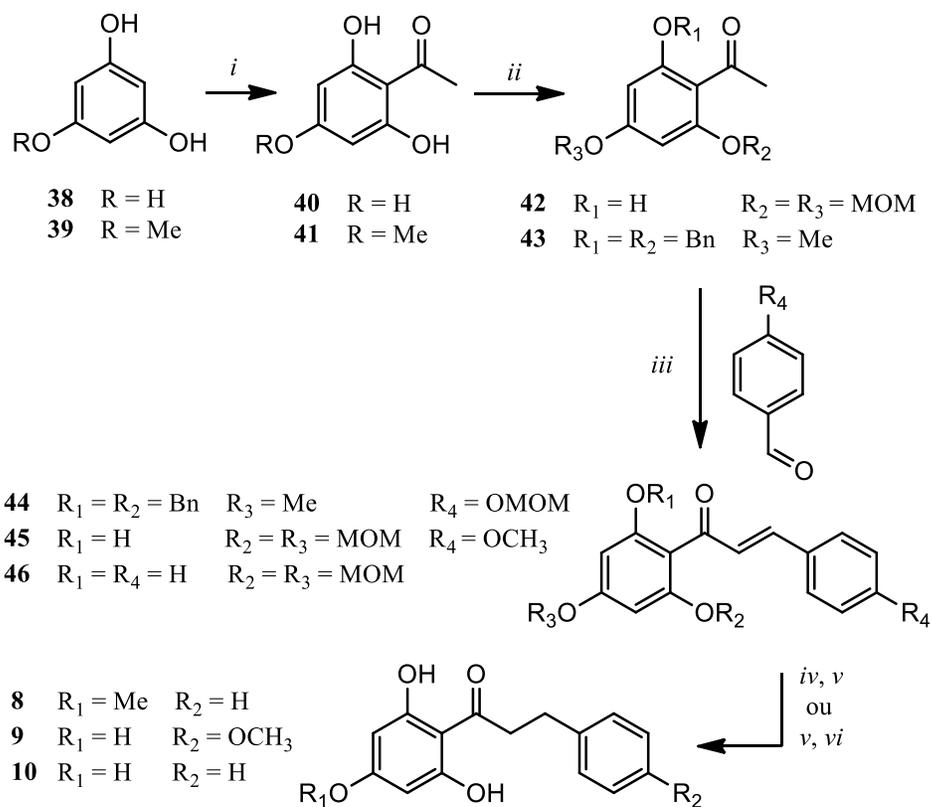


Schéma 3 : Synthèse totale des DHC **8** à **10**

(i) CH₃COCl, AlCl₃, DCM, TA, ON, 54 % **41**¹⁴; (ii) a) MOMCl, DIPEA, DCM, TA, 40 min, 71 % **42**¹³ ou b) BnBr, K₂CO₃, DMF, 80 °C, ON, 80 % **43**¹⁴; (iii) 50 % KOH (aq), MeOH, reflux ou TA, 5 ou 18 h, 92 % **44** ou 84 % **45** et 95 % **46**^{13,14}; (iv) H₂, Pd/C, DCM/MeOH, TA, 16 h, 89 %¹⁴; (v) a) HCl 12M, MeOH, TA, 12 h, 95 % **8**¹⁴ ou b) FeCl₃ · 6 H₂O, MeOH, reflux, 3 h, 80 %⁷²; (vi) a) H₂, Pd/C, MeOH, TA, 4 h, 61 % **9** ou 77 % **10**¹³ ou b) Et₃SiH, Pd/C, EtOAc/MeOH, TA, 10 min, 97 % **9** ou 94 % **10**⁷²

Une méthode de synthèse alternative consiste en une acylation de Friedel-Crafts en une étape entre le phloroglucinol **38** et un acide phénylpropanoïque **47**, catalysée par un acide de Lewis (BF₃·Et₂O). Cependant, aucune DHC précurseur de balsacones naturelles n'a été synthétisée de cette manière et cette synthèse en une étape offre des rendements variables pouvant être faibles (Schéma 4)⁷³.

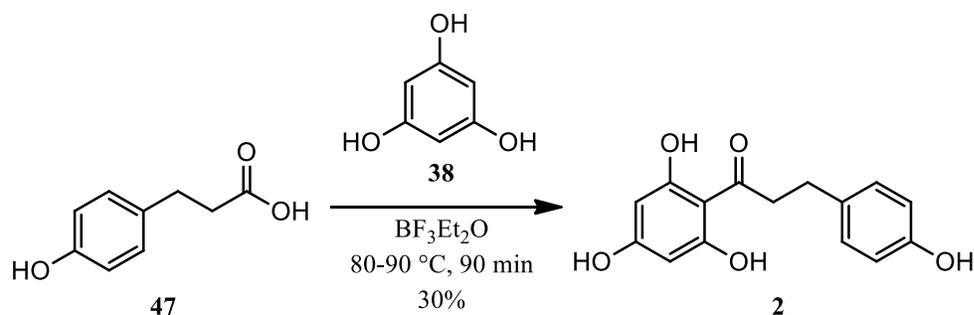


Schéma 4 : Synthèse totale alternative de DHC

Une fois les DHC précurseurs de balsacons obtenues, une des méthodes de synthèse de ces balsacons passe d'abord par la *O*-allylation d'une des fonctions phénol non-protégées de la DHC **48** pour former un éther allylique **49** qui subit ensuite un réarrangement de Claisen pour former une DHC *C*-allylée **50**. Par la suite, les fonctions phénols de la DHC sont protégées par des groupes MOM pour former le composé **51**, lequel subit ensuite une métathèse croisée avec un excès de phénylpropène protégé **52** pour former le précurseur de la balsacone A **53**. La balsacone A **25** n'a cependant pas été obtenue en raison de difficultés éprouvées lors de l'étape d'hydrolyse des groupements protecteurs MOM (Schéma 5)¹⁴.

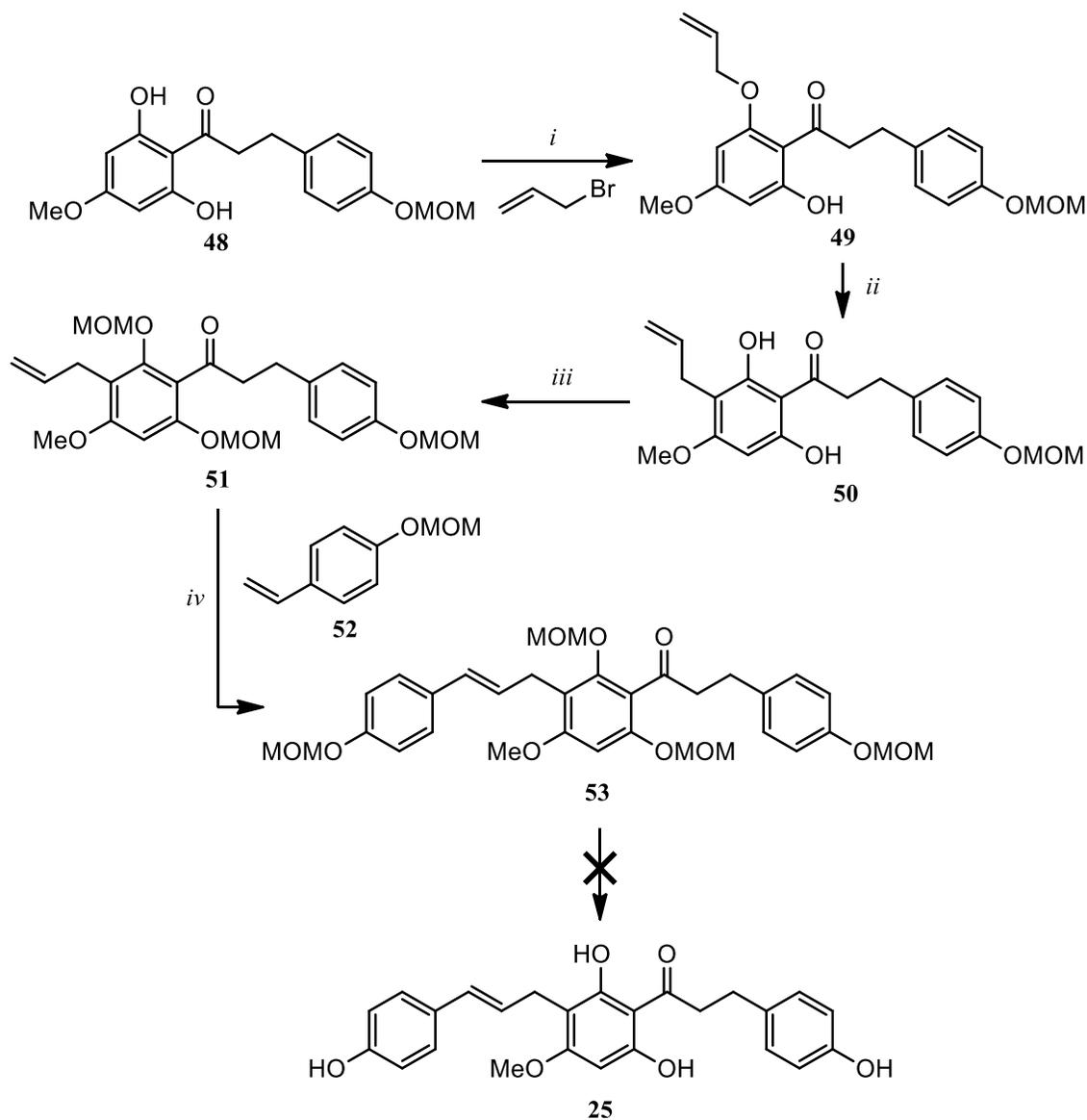


Schéma 5 : Synthèse totale d'un précurseur de la balsacone A

(i) K_2CO_3 , acétone, 60 °C, 19 h, 86 % ; (ii) Chlorobenzène, 160-170 °C, 6 h, 96 % ; (iii) MOMCl, DIPEA, DCM, reflux, 24 h, 78 % ; (iv) Catalyseur de Grubbs-2, DCM, 40 °C, 12 h, 54 %¹⁴

Une méthode différente a été rapportée pour la synthèse des balsacones B **26** et C **27** et commence par la préparation en quatre étapes d'un bromure de cinnamyle protégé **58**. Le méthyl 4-hydroxycinnamate **55** est formé à partir de l'acide 4-hydroxycinnamique **54** et sa fonction phénol est protégée par un groupe *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) pour donner

le composé **56**. Ce dernier est ensuite réduit pour donner l'alcool allylique correspondant **57**, puis halogéné pour donner un bromure de cinnamyle **58** (Schéma 6).

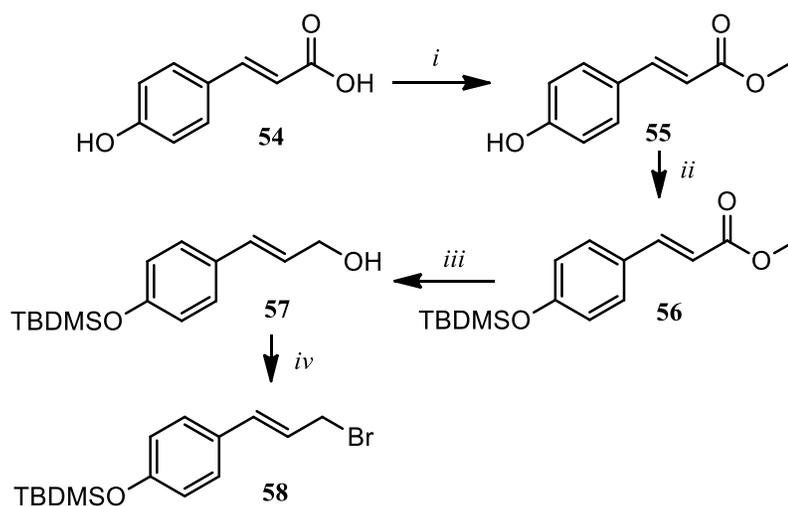


Schéma 6 : Synthèse du composé **58**

(i) APTS, MeOH, reflux, 17 h, 92 % ; (ii) TBDMSCl, TEA, DCM, 90 min, 99 % ; (iii) DIBAL-H, DCM, -78 °C, 30 min, 99 % ; (iv) PBr₃, éther diéthylique, 0 °C, 30 min, 96 % ¹³

Enfin, l'alkylation de la DHCb **9** ou DHCc **10** par le composé **58** permet d'obtenir respectivement la balsacone B **26** et la balsacone C **27** après avoir clivé les groupes TBDMS du composé **59** ou **60** avec du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) (Schéma 7) ¹³.

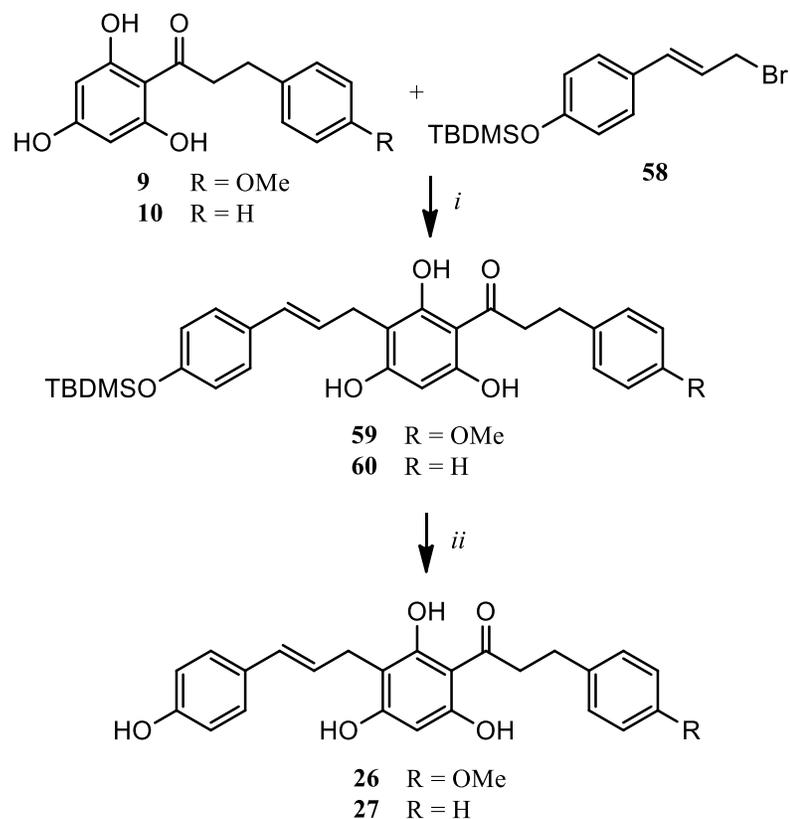


Schéma 7 : Synthèse totale des balsacones B (**26**) et C (**27**)

(*i*) a) NaH, THF, TA, 22 h, 45 % **59** ; b) NaH, THF, TA, 24 h, 50 % **60** ; (*ii*) TBAF, TFA, 0 °C, 30 min, 50 % **26** ou 55 % **27**¹³

Ces méthodes de synthèse des balsacones posent cependant des enjeux écologiques et de sécurité (économie d'atomes, traitement des déchets, risques pour la santé)⁷⁴ puisqu'elles passent par l'utilisation de précurseurs issus de la pétrochimie, nécessitent de nombreuses étapes de synthèse employant des groupes protecteurs (MOM, EOM, TBDMS) et impliquent l'utilisation de réactifs halogénés nocifs comme le tribromure de phosphore (PBr₃) ou encore le chlorure d'aluminium (AlCl₃) utilisé en très grande quantité pour l'étape d'acylation (**Schéma 3**, étape *i*)^{13, 14}.

1.2.4 Hypothèse biosynthétique

Ollis *et al.*^{15, 75} ont proposé une voie de biosynthèse plausible des cinnamylphénols, dont les balsacones font partie, qui pourrait être réalisée entre un alcool cinnamique activé et un phénol dans milieu légèrement acide. Cette cinnamylation directe pourrait être réalisée avec un cinnamylpyrophosphate¹⁵ ou avec un alcool cinnamique protoné⁷⁶. Cette transformation a été proposée comme pouvant être une voie biosynthétique à la fois des cinnamylphénols et des néoflavonoïdes (3,3-diarylpropènes). En effet, ces composés naturels, qui sont retrouvés en cooccurrence chez le genre *Dalbergia* et *Machaerium*, sont du même type que les produits et les sous-produits obtenus en laboratoire avec cette même méthode d'alkylation^{15, 75, 77, 78}. Par exemple, les composés **63** et **64**, synthétisés à partir de 2-méthoxyquinol **61** et d'alcool cinnamique **62** en conditions acides, sont aussi retrouvés en cooccurrence chez le genre *Dalbergia* (Schéma 8)^{79, 80}.

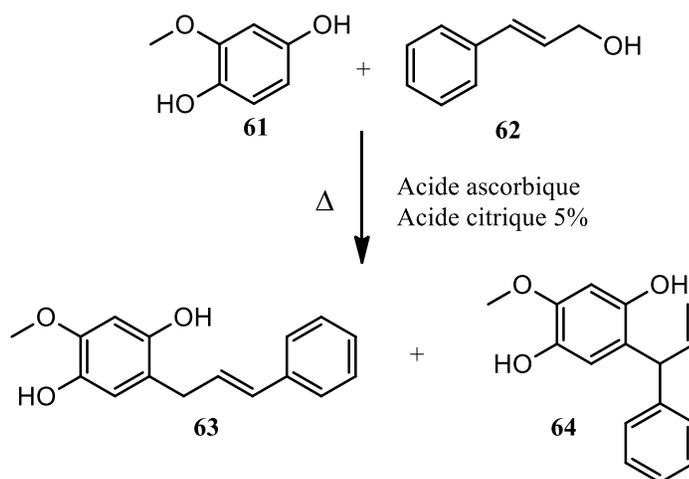


Schéma 8 : Synthèse des composés **63** et **64** retrouvés chez *Dalbergia*

De la même manière, la présence simultanée de DHC sous la forme de 3,3-diarylpropène **65** et de dérivés cinnamylés **29**, **66** chez *I. laevis* a été observée (**Figure 8**) et pourrait résulter de la cinnamylation directe des DHC correspondantes ¹⁶. Plus largement, ce type d'alkylation réalisée en laboratoire (**Schéma 9**) ⁸¹ donne de multiples produits dont les structures sont analogues à celles de composés naturels comme les balsacones monoalkylés et dialkylés. Ceci suggère que la voie biosynthétique proposée par Ollis *et al.* pourrait être envisageable pour expliquer la formation de ces balsacones.

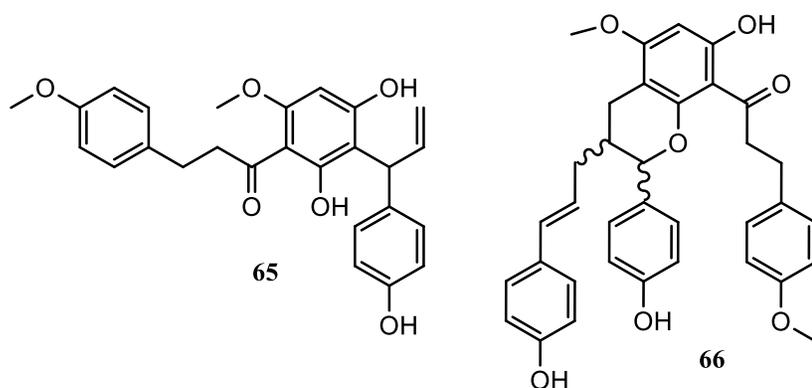


Figure 8 : Structure des composés **65** et **66** retrouvé chez *I. laevis*

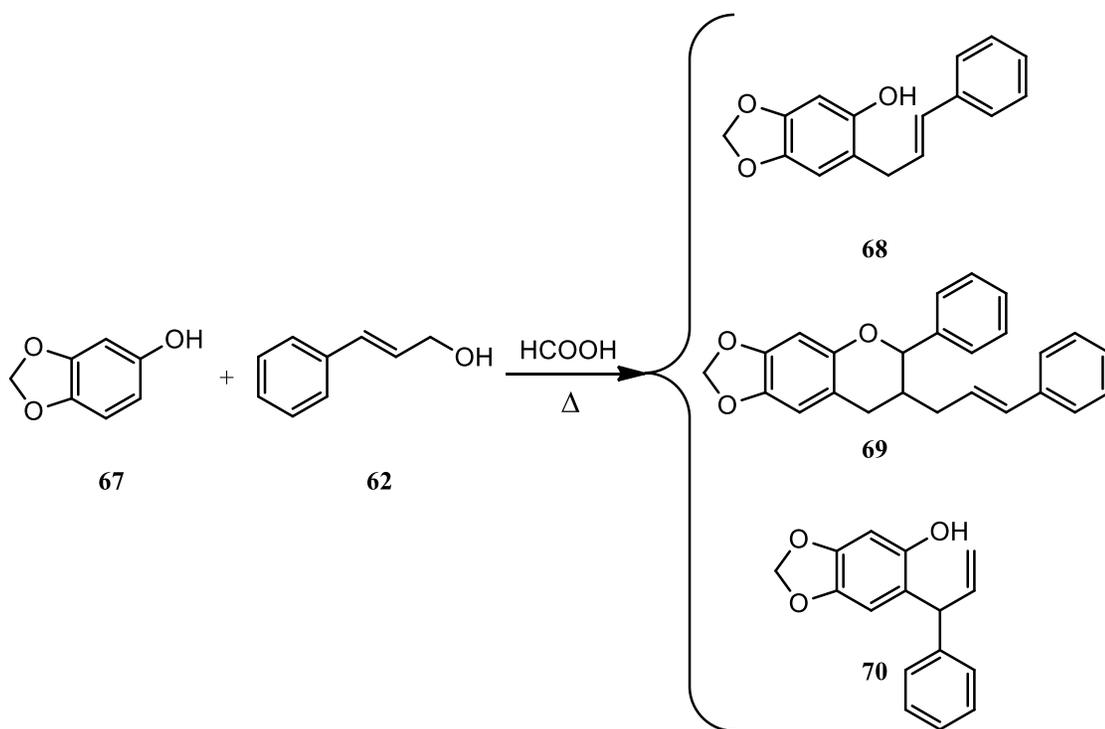


Schéma 9 : Synthèse des composés **68** à **70**

1.2.5 Hémisynthèse biomimétique et verte des balsacones

Pour pallier le faible rendement d'isolation des balsacones à partir de *P. balsamifera*⁹ et les enjeux posés par la synthèse totale^{13, 14}, il est possible d'hémisynthétiser ces balsacones grâce à une méthode rapportée par Alsarraf *et al.*¹⁷. Cette approche repose sur le principe d'une simple alkylation de Friedel-Crafts (FC) dans des conditions acides comparables à celles rapportées par Jurd *et al.*^{80, 81}.

L'alkylation de FC est nommée en référence aux chimistes C. Friedel et J. M. Crafts qui, en 1877, ont développé une méthode d'alkylation entre un chlorure d'amyle **71** et le benzène **72** pour former un amyle de benzène **74**. La réaction est réalisée en présence d'un

acide de Lewis (AlCl_3) qui permet de rendre électrophile le carbone lié au groupe partant formé (AlCl_4). Une fois la substitution faite, le carbocation formé est stabilisé par sa forme d'intermédiaire de Wheland **73** puis sa déprotonation conduit à la formation de l'amyloxy de benzène **74** (**Schéma 10**)⁸². Depuis la découverte de l'alkylation de FC, de nombreux autres acides de Lewis ont été utilisés comme le trifluorure de bore (BF_3) ou d'autres chlorures de métaux (BeCl_2 , TiCl_4 , SbCl_5 , SnCl_4). Des acides forts de Brønsted comme l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique peuvent également être utilisés comme catalyseur⁸³. Cette méthode d'alkylation présente cependant de nombreux problèmes d'un point de vue écologique et de santé étant donné que les halogénures d'alkyles utilisés sont toxiques. De plus, le traitement des sels de métaux issus de la réaction est compliqué^{83,84}.

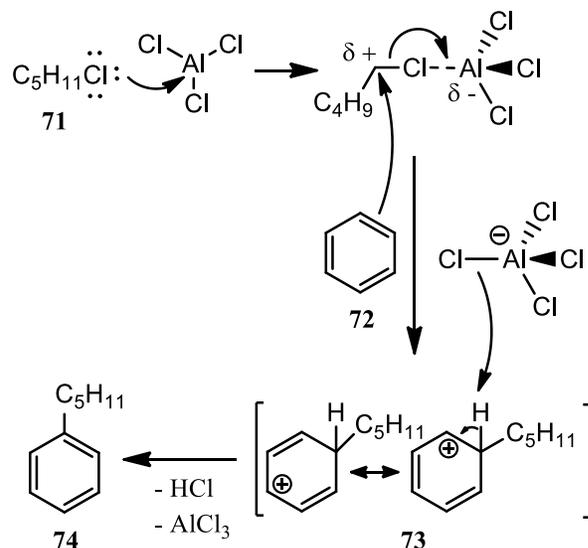


Schéma 10 : Mécanisme de la méthode d'alkylation développée par Friedel et Crafts

En 1996, les premiers essais d'alkylation de FC catalytiques avec des alcools benzyliques et allyliques comme électrophiles en présence d'un catalyseur au scandium ($\text{Sc}(\text{SO}_3\text{CF}_3)_3$) ont été réalisés (**Schéma 11**)⁸⁴ et ont ouvert la voie à l'utilisation d'une

multitude d'autres acides de Lewis comme catalyseur ⁸³. Ce type d'alkylation a pour avantage de ne générer que de l'eau en proportion stœchiométrique comme co-produit de réaction et de n'utiliser le triflate de scandium qu'en proportion catalytique (10 % mol). Ce catalyseur peut également être récupéré et recyclé dans une nouvelle réaction ⁸⁴.

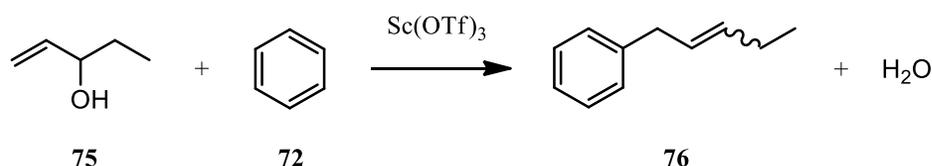


Schéma 11 : Alkylation de FC entre le 1-pentèn-3-ol 75 et le benzène 72 pour former le pent-2-enylbenzène 76

Des méthodes d'alkylation similaires mais utilisant des acides de Brønsted comme catalyseur ont aussi été développées vingt ans plus tard. Sanz *et al.* ⁸⁵ rapportent une méthode d'alkylation efficace avec des alcools allyliques ou benzyliques comme électrophiles et utilisant de l'APTS (acide 4-toluènesulfonique) monohydraté ou de l'APTS supporté comme catalyseur (**Schéma 12**) ⁸⁵. L'utilisation de nombreux autres acides forts de Brønsted comme catalyseur (HCl, CF₃COOH, CF₃SO₃H et H₂SO₄) a rapidement été rapportée par la suite ⁸⁶.

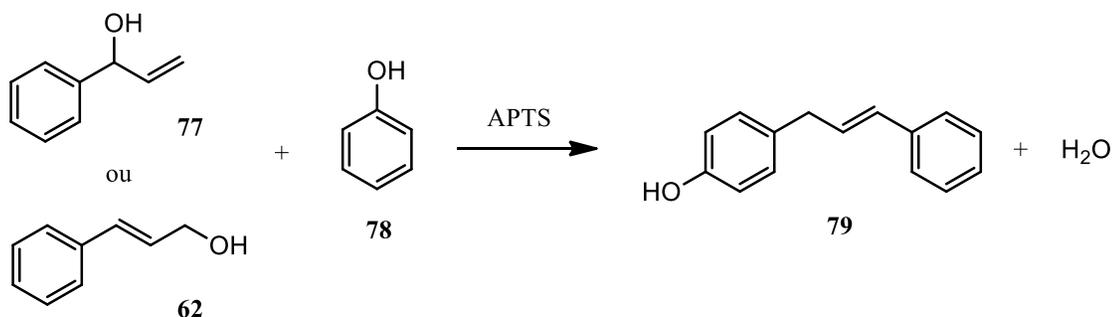


Schéma 12 : Alkylation de FC entre l'alcool allylique **77** ou l'alcool cinnamique **62** et le phénol **78** pour former le composé **79**

En utilisant cette méthode de synthèse qui offre de nombreux avantages dans le cadre de la chimie verte, Alsarraf *et al.*¹⁷ ont été en mesure d'hémisynthétiser des balsacones **25** à **27** à partir des DHC **8** à **10**, issues de *P. balsamifera* et de *K. angustifolia*, et de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80**⁸⁷. L'alcool 4-hydroxycinnamique **80** est d'abord déshydraté par l'APTS et le carbocation en résultant subit ensuite une attaque nucléophile par le cycle aromatique A de la DHC qui est fortement activé par les trois fonctions phénoliques. L'aromaticité du cycle central de la balsacone est enfin restaurée par la captation d'un proton par l'ion tosylate, régénérant ainsi le catalyseur (**Schéma 13**).

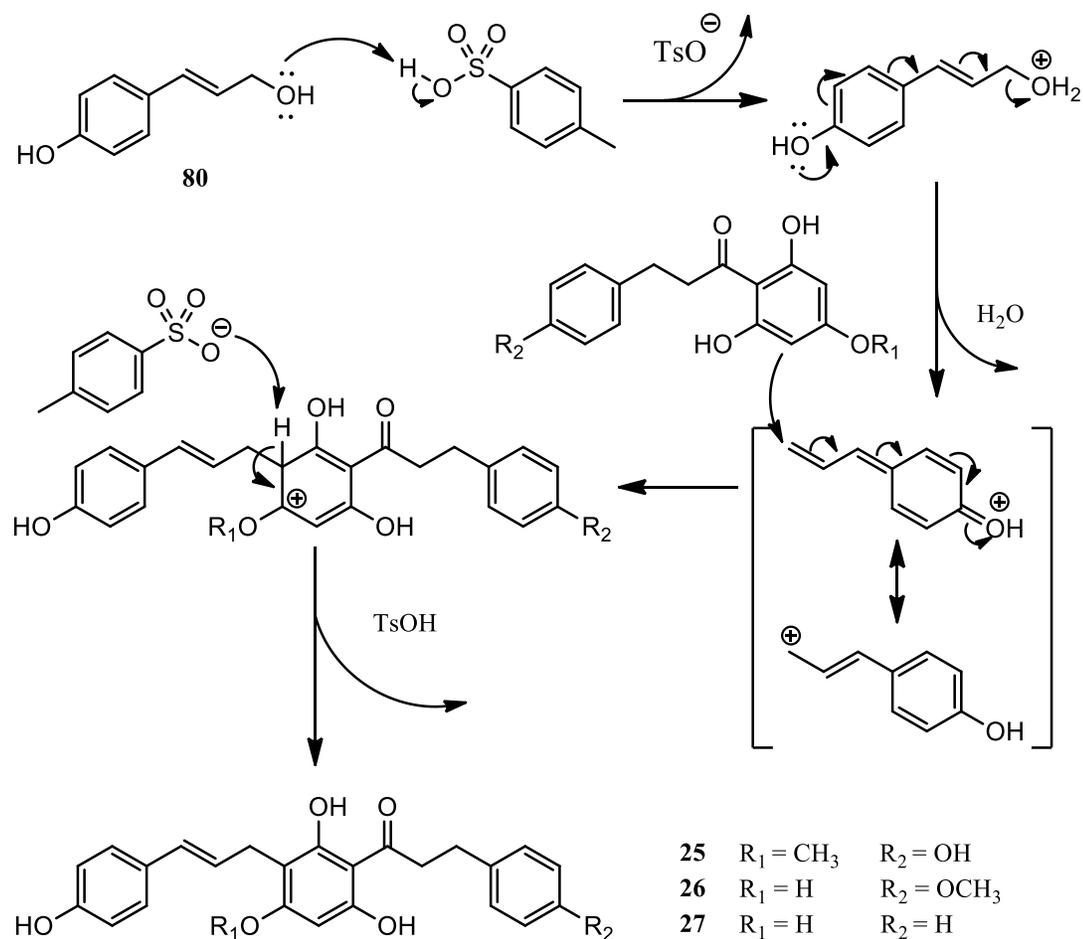


Schéma 13 : Mécanisme de l'hémisynthèse des balsacones **25** à **27**

APTS, MeCN, TA, 2 h, 70 % **25**, 51 % **26**, 56 % **27**

Ce procédé permet de produire des balsacones en une seule étape catalytique, sans groupes protecteurs et produisant de l'eau comme seul co-produit de réaction. Cette méthode offre plusieurs avantages par rapport aux synthèses totales des balsacones déjà rapportées. L'utilisation de substrats biosourcés fait que chaque atome de carbone du produit final est d'origine végétale et, contrairement à la synthèse totale des balsacones B **26** et C **27** développée par Burmaoğlu¹³, aucun halogénure ou groupement protecteur n'est utilisé lors de l'étape d'alkylation. Par ailleurs, l'hémisynthèse présentée ici se réalise en

une seule étape contrairement à la synthèse totale de la balsacone A **25** développée par Polat ¹⁴ qui passe par une allylation, puis un réarrangement de Claisen et une métathèse, en plus d'utiliser des groupements protecteurs.

Un ratio DHC/alcool de 4:1 est utilisé afin de défavoriser les réactions de polyalkylations qui sont inhérentes aux alkylations de FC ¹⁷. Une réaction comparable entre un excès de pyrogallol et de l'alcool cinnamique **62** dans de l'acide acétique à chaud et produisant un produit de monoalkylation est également documenté ⁷⁶. Cependant, même avec un excès de nucléophile, des cas de polyalkylation surviennent tout de même, notamment avec la réaction de dialkylation-cyclisation entre la DHCa **8** et l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** qui forme la balsacone K **28** ¹⁸. Cette dernière est formée suite à la réaction de la balsacone A **25** avec une nouvelle molécule d'alcool 4-hydroxycinnamique **80**. Cependant, dans ce cas, c'est la liaison allylique de l'unité 4-hydroxycinnamyle qui agit comme nucléophile plutôt que le cycle aromatique A de la balsacone A **25**. Le cation intermédiaire réagit de façon intramoléculaire avec une fonction phénol du cycle pentasubstitué pour conduire à la balsacone K **28** (Schéma 14).

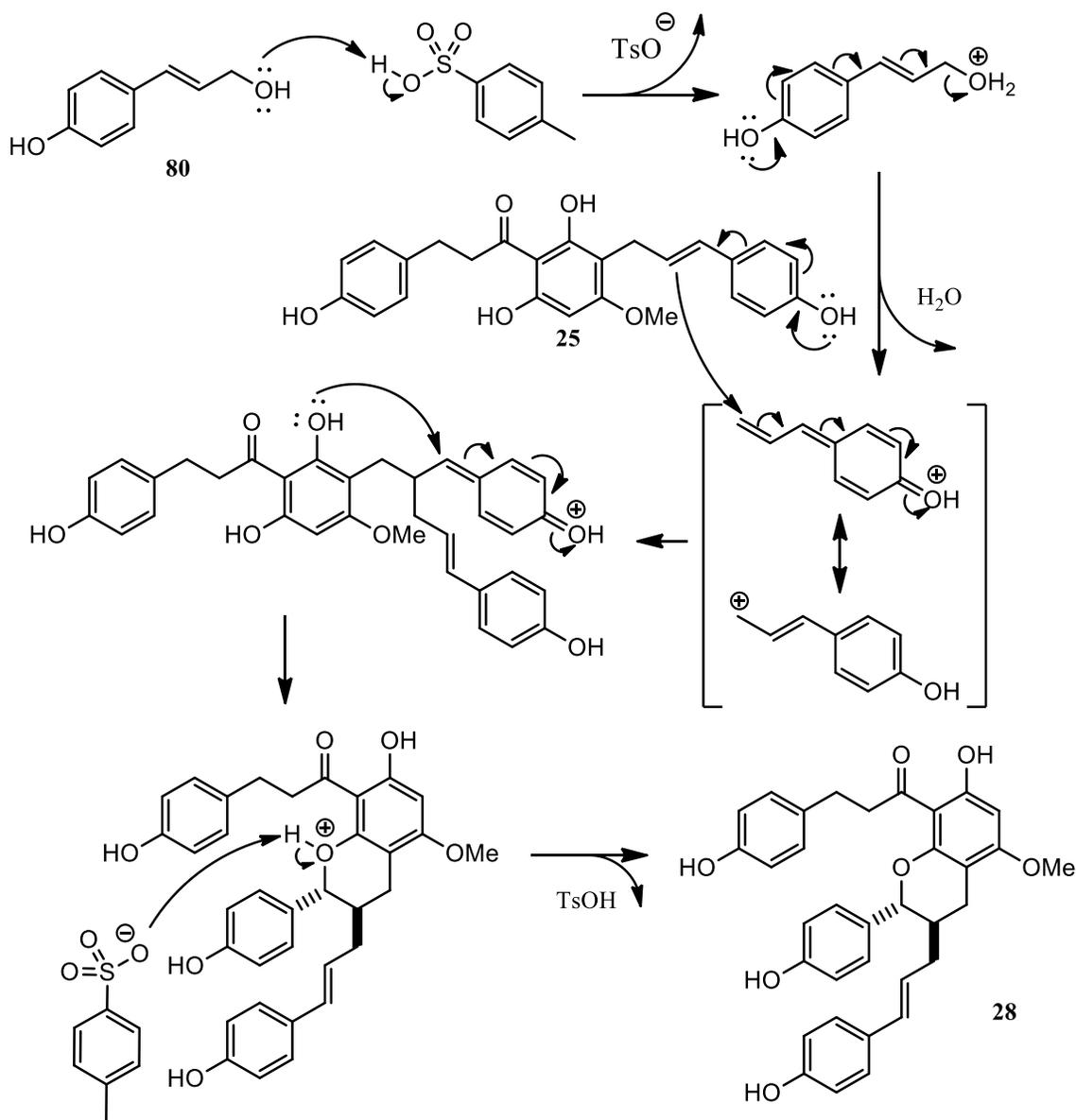


Schéma 14 : Mécanisme de la synthèse de la balsacone K **28**

Par ailleurs, un cas de monoalkylation-cyclisation sur la DHCa **8** avec l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** formant la balsacone F **81** (**Schéma 15**) comme sous-produit de réaction a été rapporté lors de la synthèse de la balsacone A **25**. La balsacone F **81** était le produit majoritaire dans des conditions de reflux et en milieu très acide (40 % mol du catalyseur TFBA) et avec un ratio DHC/alcool de 3:1^{18, 88}.

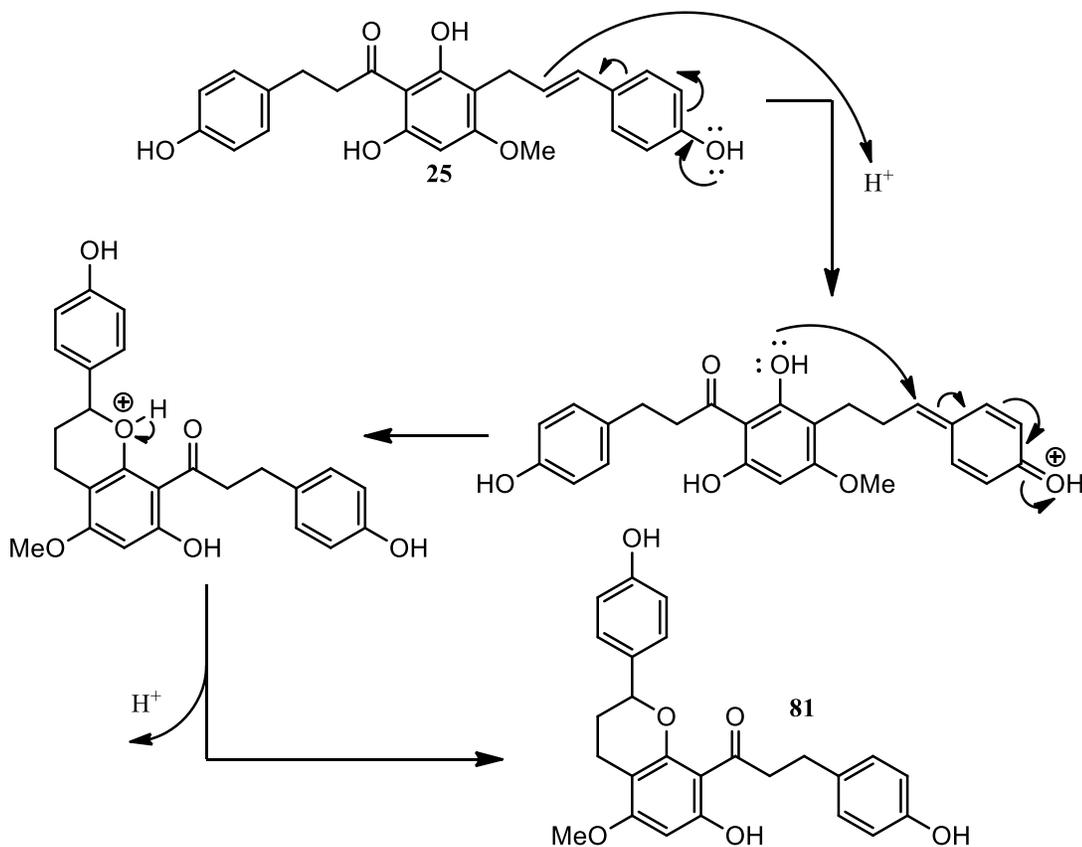


Schéma 15 : Mécanisme de la formation de la balsacone F **81**

Ce type de réaction a déjà été rapporté avec des conditions acides similaires pour former des produits de mono **83** et de double cinnamylation **84** et un produit monoalkylé-cyclisé **85** à partir d'une flavone **82** et d'un excès d'alcool cinnamique **62** (Schéma 16) ⁸⁹.

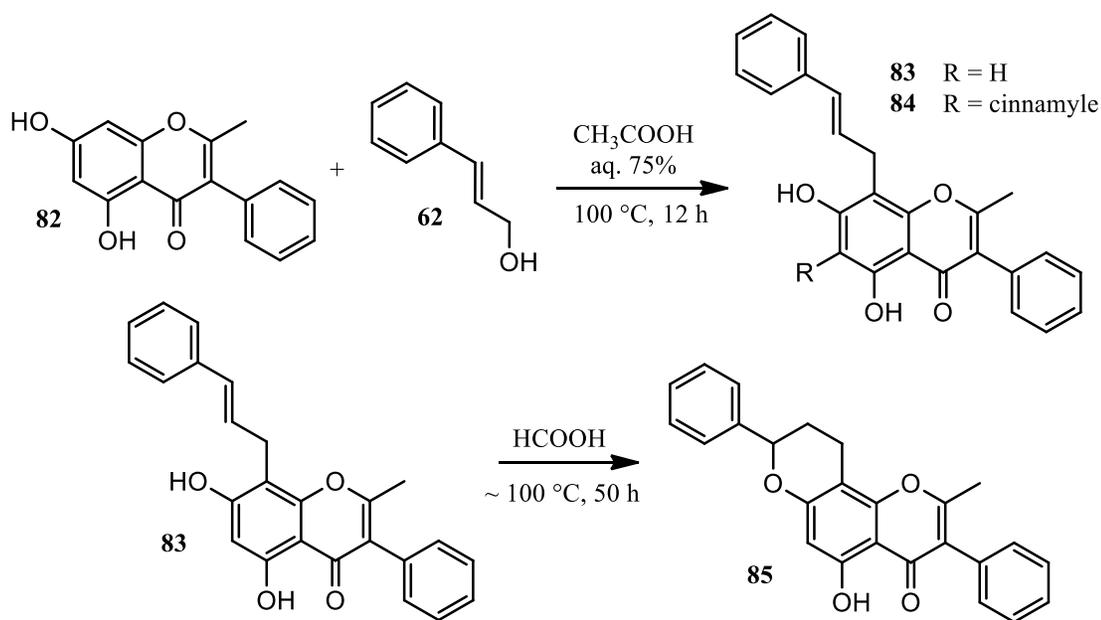


Schéma 16 : Synthèse des composés **83** à **85**

Cette méthode d'hémisynthèse des balsacones est intéressante, tant en termes d'efficacité que de chimie verte (substrats biosourcés, innocuité des réactifs, économie d'atomes, d'énergie et de temps). De plus, le rendement d'extraction des DHC à partir de *P. balsamifera* est relativement intéressant par rapport à celui depuis d'autres sources de DHC connues (**Tableau 2**). Néanmoins, les DHC précurseurs des balsacones restent difficiles d'accès puisque leur isolation nécessite un procédé de purification complexe similaire à celui de l'isolation des balsacones¹⁸. Certains glycosides de DHC précurseurs comme l'asébotine **7**, un *O*-glucoside de la DHCa **8**, sont également présents chez certains végétaux, notamment chez *K. angustifolia*^{52, 90} qui est une espèce très répandue au Québec⁷. Ceux-ci peuvent être hydrolysés pour obtenir la DHC correspondante. Cependant, là aussi subsiste l'enjeu de l'isolation de ces précurseurs. Il semble donc pertinent de chercher à développer une méthode de production de balsacones naturelles antibactériennes qui

permet de contourner l'isolation des DHC précurseurs tout en conservant la méthode d'hémisynthèse verte déjà mise au point par Alsarraf *et al.*¹⁷.

Tableau 2 : Sources de DHC (**8** à **10**) précurseurs des balsacones A, B et C (**25** à **27**)

DHC	Source végétale	Partie utilisée	Rendement d'extraction (mg/kg) [‡]	Réf.
DHCa 8	<i>Pieris japonica</i>	feuilles	100	91
	<i>Greyia flanaganii</i> Bolus	feuilles	2,9 [†]	92
	<i>Piper aduncum</i> L.	feuilles	325	93
	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	feuilles	12 [†]	94
	<i>Piper dennisii</i> Trel.	feuilles	310	95
	<i>Piper elongatum</i> Vahl	parties aériennes	35	96
	<i>Piper longicaudatum</i> Trel. & Yunck.	feuilles et branches	66	97
	<i>Etingera littoralis</i> (J. Koenig) Giseke	rhizomes	24	98
	<i>Populus balsamifera</i>	bourgeons	30	9
DHCb 9	<i>Iryanthera laevis</i>	fruits (arille)	242	99
	<i>Iryanthera sagotiana</i> (Benth.) Warb.	fleurs	12 [†]	100
	<i>Populus balsamifera</i>	bourgeons	57	9
DHCc 10	<i>Lindera umbellata</i> Thumb.	feuilles	72	101
	<i>Lindera umbellata</i> var. <i>lancea</i> Momiyama	feuilles	70	102
	<i>Boesenbergia pandurata</i> Holtt.	rhizomes	3,8	103
	<i>Etingera littoralis</i>	rhizomes	54	98
	<i>Greyia flanaganii</i>	feuilles	3,6 [†]	92
	<i>Helichrysum tenuifolium</i> Killick	parties aériennes	2500	104
	<i>Populus balsamifera</i>	bourgeons	29	9

[‡] Calculé en milligramme de DHC par kilogramme de matière végétale sèche

[†] Calculé en milligramme de DHC par gramme d'extrait (masse de matière végétale non disponible)

1.3 Hypothèses et objectifs

Dans ce contexte, l'objectif du présent travail de maîtrise est de réaliser les hémisynthèses de balsacones directement dans des extraits naturels riches en DHC. Cette approche de « potentialisation » d'extraits fera l'économie des étapes de fractionnement

nécessaires à l'isolation des DHC. La consommation des DHC et l'enrichissement en balsacones seront quantifiés par CLHP et devraient se traduire par une amélioration des propriétés antibactériennes des extraits (**Schéma 17**). Par ailleurs, cette méthode d'hémisynthèse *in situ* permettrait de développer une nouvelle approche de valorisation d'extraits naturels jusque-là peu considérés en dehors de la sphère de la médecine traditionnelle.

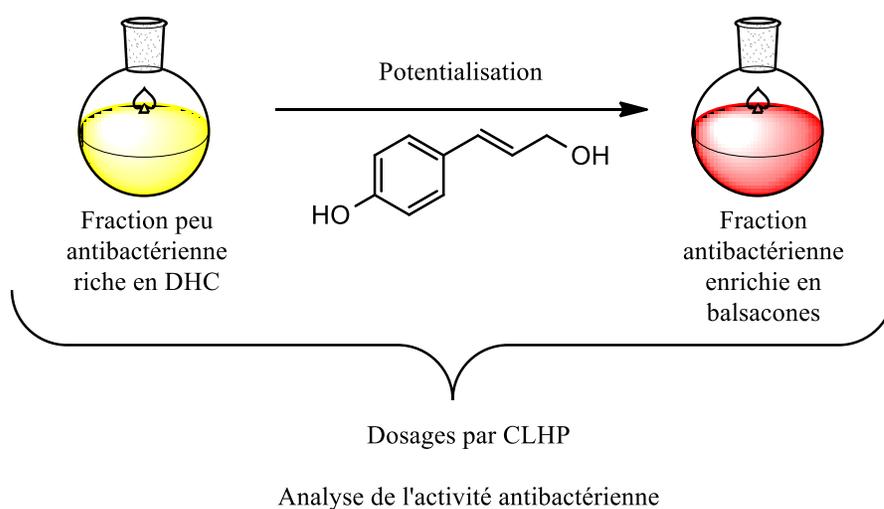


Schéma 17 : Principe du travail de maîtrise

CHAPITRE 2 RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Potentialisations

2.1.1 Extraction et fractionnement

L'objectif principal du fractionnement de l'extrait de bourgeons de peuplier baumier est de récupérer une fraction riche en DHC 8 à 10 afin de l'enrichir en balsacones par hémisynthèse. Les bourgeons de peuplier baumier (50 g) ont été extraits avec de l'éthanol 95 % à reflux et une portion de l'extrait sec (16 g sur 22 g totaux) a été fractionné grossièrement par chromatographie sur colonne en phase inverse (résine synthétique apolaire adsorbante Diaion HP20) pour obtenir huit fractions de polarité décroissante (**A** à **H**). Les fractions **A** et **B** ont été lavées avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 afin d'en éliminer les acides organiques pour obtenir les fractions **A2** et **B2**. La fraction **A2**, qui contient en majorité les DHC 8 à 10, a été utilisée pour réaliser les hémisynthèses *in-situ*. Les fractions **B** et **B2** contiennent en majorité un mélange de DHC 8 à 10 et de balsacones 25 à 27. La fraction **C** contient en majorité des balsacones 25 à 27 et les fractions **D** à **H** contiennent d'autres composés relativement apolaires.

2.1.2 Essais préliminaires d'hémisynthèse *in situ*

L'objectif principal de ce travail était de parvenir à développer une méthode d'hémisynthèse des balsacones directement dans un extrait riche en DHC afin d'en améliorer les propriétés biologiques. Cette méthode d'hémisynthèse *in situ* s'inspire des conditions développées pour l'hémisynthèse des balsacones à partir des DHC isolées ¹⁷. Des essais préliminaires d'hémisynthèse *in situ* utilisant de l'APTS monohydraté dissout se sont révélés encourageants puisque le suivi par CCM a montré une consommation complète de l'alcool allylique et la formation de balsacones. Cependant, le traitement de la réaction présente plusieurs problèmes. Le lavage de l'extrait avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 , afin d'éliminer l'APTS de l'extrait, présente un risque élevé d'émulsion et un risque d'altérer l'intégrité de l'extrait en lavant des composés polaires. Conséquemment, il était souhaitable de continuer de développer et d'optimiser la méthode d'hémisynthèse *in situ* (Schéma 18).

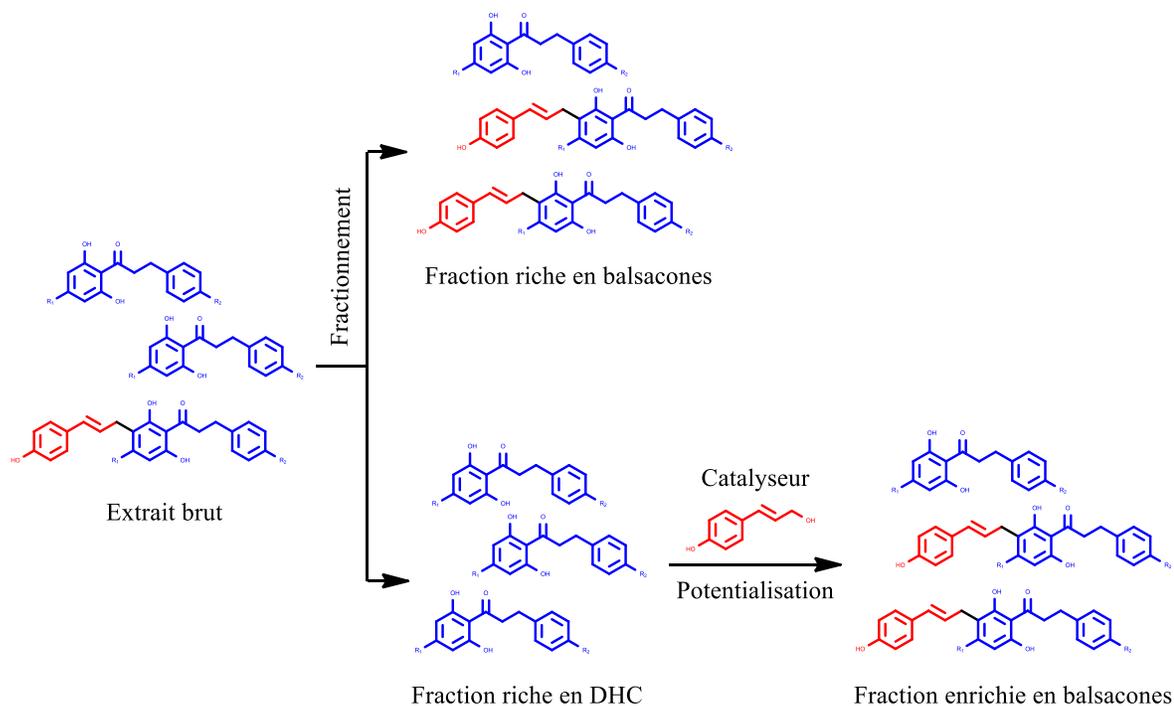


Schéma 18 : Méthode d'hémisynthèse *in situ*

2.1.3 Optimisation de l'hémisynthèse *in situ*

Les hémisynthèses *in situ* sont réalisées en faisant réagir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** avec une portion de la fraction **A2** solubilisée dans l'acétate d'éthyle et en présence d'un catalyseur recyclable (APTS supporté). Suite à des essais concluants, l'acétonitrile initialement utilisé ¹⁷ a été remplacé par l'acétate d'éthyle principalement pour des raisons d'innocuité ¹⁰⁵. Le mélange réactionnel est ensuite simplement filtré sur verre fritté afin de récupérer le catalyseur et l'acétate d'éthyle du filtrat est évaporé. L'APTS monohydraté initialement utilisé pour l'hémisynthèse des balsacones ¹⁷ a été remplacé par de l'APTS supporté afin d'éviter l'étape de lavage de l'extrait enrichi qui pourrait nuire à l'intégrité de ce dernier en plus de comporter des

risques élevés d'émulsion. Cependant, la tentative de substitution de l'APTS soluble pour son homologue supporté, tout en gardant les mêmes proportions catalytiques, s'est révélée infructueuse. Il a donc été nécessaire d'augmenter la proportion d'APTS supporté engagé dans la réaction à un niveau tel qu'il n'est plus possible de parler de proportion catalytique d'APTS supporté mais plutôt de proportion stœchiométrique. En effet, à raison d'environ 2 mmol d'APTS greffé sur 1 g de polymère, la quantité d'APTS supporté utilisé pour les hémisynthèses *in situ* équivaut à deux fois le nombre de moles d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** utilisé dans la réaction.

La **Figure 9** permet de constater qualitativement que le traitement de la fraction riche en DHC (**A2**) par de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** en présence d'un acide de Brønsted (APTS) se traduit par la consommation des DHC **8** à **10** et par la formation des balsacones correspondantes **25** à **27**. Le dosage des DHC et des balsacones d'intérêt par CLHP est détaillé dans la suite du document.

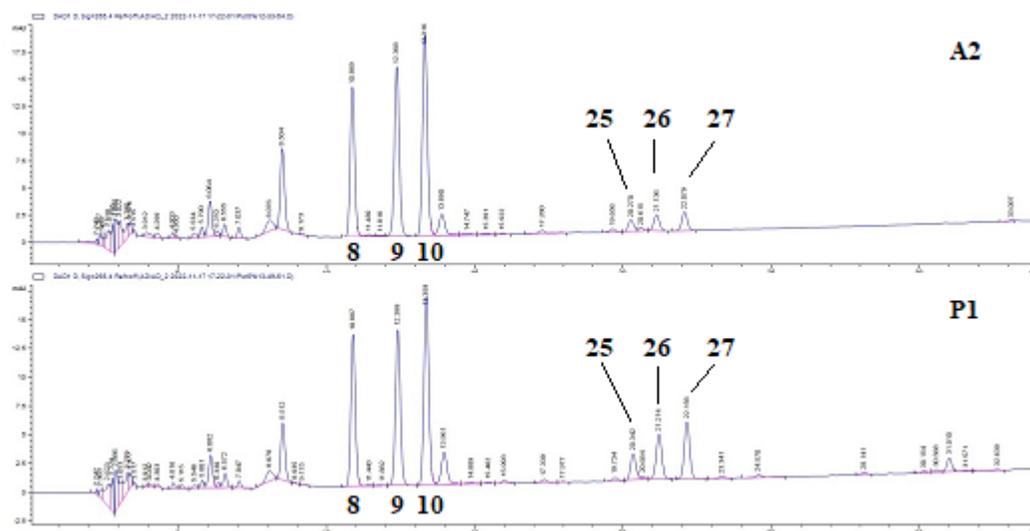


Figure 9 : Chromatogrammes CLHP de la fraction riche en DHC **A2** (en haut) et de la fraction enrichie avec 5 %m d'alcool 4-hydroxycinnamique **P1** (en bas) à 265 nm

Malgré la simplicité de la méthode d'hémisynthèse, les alkylations de FC présentent un enjeu de polyalkylation étant donné que la formation de la première unité 4-hydroxycinnamyle sur le cycle aromatique de la DHC participe à l'activation de celui-ci. Pour pallier ce phénomène et favoriser la formation de balsacones monoalkylés (**25** à **27**), l'hémisynthèse à partir de DHC isolées fait intervenir un excès de DHC (4 mol de DHC pour 1 mol d'alcool)¹⁷. Considérant cet enjeu, la quantité d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** engagé dans les hémisyntheses *in situ* est modulée afin d'optimiser la production de balsacones A, B et C (**25** à **27**) dans la fraction sans pour autant viser la consommation totale des DHC dans l'extrait. En effet, ceci favoriserait les réactions secondaires de polyalkylation au détriment du rendement en balsacones A, B et C (**25** à **27**). Dans ce but, plusieurs essais d'hémisyntheses *in situ* ont donc été réalisés avec différentes proportions d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** dans l'extrait: 5 %m (**P1**), 10 %m (**P2**), 15 %m (**P3**), 20 %m (**P4**), 30 %m (**P5**) et 35 %m (**P6**).

2.1.4 Recyclage de l'APTS supporté

Dans une perspective d'efficacité et de réduction de l'impact environnemental, il est pertinent de chercher à recycler l'APTS supporté qui est utilisé en proportion stœchiométrique. La recyclabilité de l'APTS supporté a été évaluée en réalisant trois hémisynthèses *in situ* de balsacones sur une fraction riche en DHC d'un extrait de bourgeons de *P. balsamifera* et en utilisant le même APTS supporté au cours des trois essais successifs. À la fin de chaque réaction, l'APTS supporté a été filtré sur verre fritté, rincé à l'acétate d'éthyle et séché pour ensuite être réutilisé. Suite à un suivi CCM, la première hémisynthèse a été complétée en 4 h alors que la seconde était incomplète après 4 h d'agitation, une trace d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** ayant été observée par CCM dans le mélange réactionnel. La troisième hémisynthèse est aussi incomplète après 4 h d'agitation et une présence qualitativement plus importante d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** a été détectée par CCM, ce qui témoigne d'une perte d'efficacité de l'APTS supporté. L'adsorption de composés sur la surface des billes de polymère pourrait réduire la surface de contact entre les réactifs et le catalyseur et donc être responsable de cette perte d'efficacité.

Trois autres essais de recyclage de l'APTS supporté ont été réalisés avec une méthode identique hormis l'agitation qui a duré 18 h plutôt que 4 h et le suivi par CCM a montré, dans les trois cas, une conversion complète de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80**. Il semble donc que la perte d'efficacité de l'APTS supporté puisse être compensée par une durée d'agitation plus longue, ce qui n'est pas un enjeu dans la mesure où la réaction se fait à température ambiante. Qui plus est, malgré le fait que l'APTS supporté ne soit pas efficace

en proportion catalytique lors de l'hémisynthèse *in situ*, son recyclage compense la nécessité de l'utiliser en proportion stœchiométrique.

2.2 Dosage par CLHP et analyses par CL-SM

2.2.1 Production des standards pour les dosages

2.2.1.1 Production des DHCb 9 et DHCc 10

Les DHC 8 à 10 et les balsacones 25 à 28 ont été préparées afin de servir de standard pour les dosages des extraits par CLHP et la balsacone C 27 a également servi de contrôle pour l'évaluation des propriétés antibactériennes des extraits enrichis. La DHCb 9 et la DHCc 10 ont été synthétisées en adaptant la méthode de Siddaiah *et al.*⁷³ utilisée pour préparer des DHC analogues. La synthèse des DHC 9 et 10 se fait en une étape en faisant réagir du phloroglucinol 38 avec de l'acide phénylpropionique et en utilisant du diéthyléthérate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) à la fois comme solvant et comme catalyseur (Schéma 19). Bien que la réaction se fasse en une étape, les rendements de synthèse de ces deux DHC sont très faibles, respectivement 13 % et 11 %, en raison du nombre important de sous-produits générés et de la difficulté de les séparer par la méthode chromatographique employée. La synthèse d'une autre DHC trisubstituée par des groupes hydroxyles aux positions 2', 4', 6' (phlorétine, 2) par Siddaiah *et al.* offre également un rendement relativement faible (30 %) par rapport aux autres DHC substituées aux positions 2', 3', 4' ou 2', 4'. Cette méthode de synthèse pourrait donc être mal adaptée pour la production des DHC précurseurs des balsacones. Une méthode alternative qui passe par la

réduction des flavones (acacétine et chryisine) ou de flavanones ⁶³ peut être une bonne alternative pour la production des DHC **9** et **10** étant donné le faible coût de ces précurseurs potentiels et le bon rendement offert (pas de produits secondaires et purification facile).

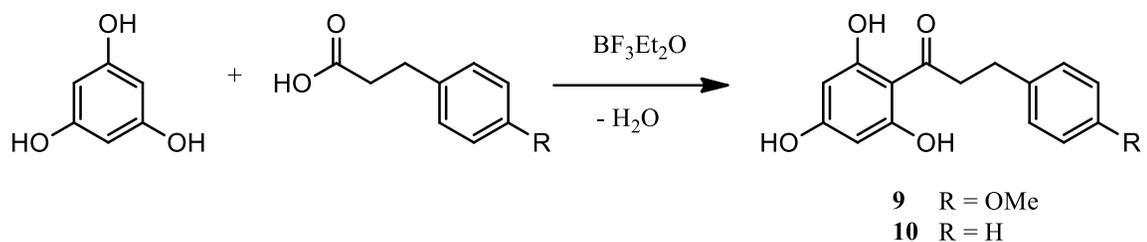


Schéma 19 : Schéma de synthèse de la DHCb **9** et de la DHCc **10**

2.2.1.2 Production de la DHCa **8** à partir de *K. angustifolia*

La DHCa **8** a été produite par l'hydrolyse acide de l'asébotine **7** issue de *K. angustifolia* étant donnée l'abondance de la plante au Québec et sa teneur élevée en asébotine **7** ⁹⁰. Les parties aériennes de *K. angustifolia* ont été extraites avec de l'éthanol 95 % à reflux et, une fois le solvant évaporé, l'extrait sec a été suspendu dans l'eau pour être lavé au dichlorométhane puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle, l'extrait sec est fractionné grossièrement par chromatographie sur colonne en phase inverse (résine synthétique apolaire adsorbante Diaion HP20). Les fractions riches en asébotine **7** ont ensuite à nouveau été purifiées par chromatographie en phase normale. Les fractions riches en asébotine **7** ont été soumises à une hydrolyse acide jusqu'à l'obtention de la DHCa **8** (**Figure 10**) qui a finalement été purifiée par une dernière chromatographie en phase normale pour atteindre un rendement de 0,58 %.

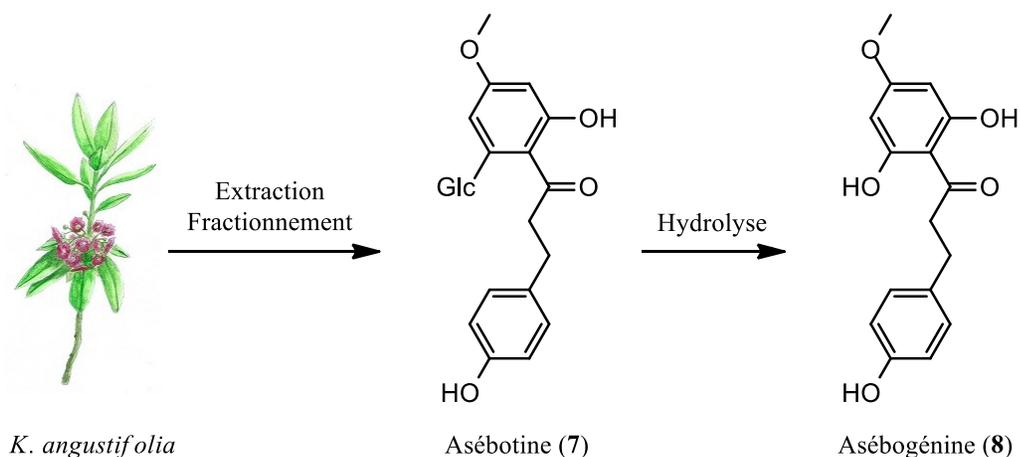


Figure 10 : Méthode de production de l'asébogénine (DHCa, **8**)

Bien qu'une deuxième séparation par chromatographie sur colonne ait suivi la première séparation sur résine Diaion, celle-ci pourrait être évitée si cette dernière permet de séparer tous les produits moins polaires que l'asébotine **7** du reste de l'extrait. L'hydrolyse acide peut ainsi être réalisée directement sur la fraction contenant l'asébotine **7** même en présence d'autres composés plus polaires puisque la DHCa **8** produite est moins polaire que l'asébotine **7**. Ceci permet de la purifier simplement et rapidement en déposant le mélange réactionnel sur un gel de silice et en éluant avec un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 pour obtenir la DHCa **8**. Néanmoins, cette méthode ne semble pas forcément plus efficace que celle proposée par Bilodeau ¹⁸ qui privilégie l'isolation de l'asébotine **7** par chromatographie en phase inverse directement après la séparation sur résine Diaion. La pureté de l'asébotine ainsi obtenu permet d'éviter l'étape de purification après l'hydrolyse du glycoside.

2.2.1.3 Synthèse des balsacones 25 à 28

Les balsacones A 25 et B 26 ont été synthétisées en utilisant la méthode proposée par Alsarraf *et al.*¹⁷ comme montré au **Schéma 20** (voie a) alors qu'une version modifiée de cette méthode a été utilisée pour la synthèse de la balsacone C 27 comme montré au **Schéma 20** (voie b). Pour les balsacones A 25 et B 26, les réactifs (80 et 8 ou 9) ont été mis en solution dans de l'acétonitrile anhydre et sous atmosphère inerte puis le catalyseur (10 % mol APTS monohydraté) en solution dans de l'acétonitrile anhydre a été ajouté. Une fois la réaction terminée et après un lavage avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃, le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne en phase inverse (C18) pour obtenir la balsacone correspondante (25 ou 26). La balsacone K 28 a été isolée comme co-produit de la synthèse de la balsacone A 25. Pour la préparation de la balsacone C 27, les réactifs (80 et 10) ont été mis en solution dans de l'acétate d'éthyle et de l'APTS supporté a été utilisé comme catalyseur plutôt que l'APTS monohydraté. Une fois la réaction terminée, le catalyseur a été filtré et le résidu issu du filtrat a été purifié par chromatographie en phase normale.

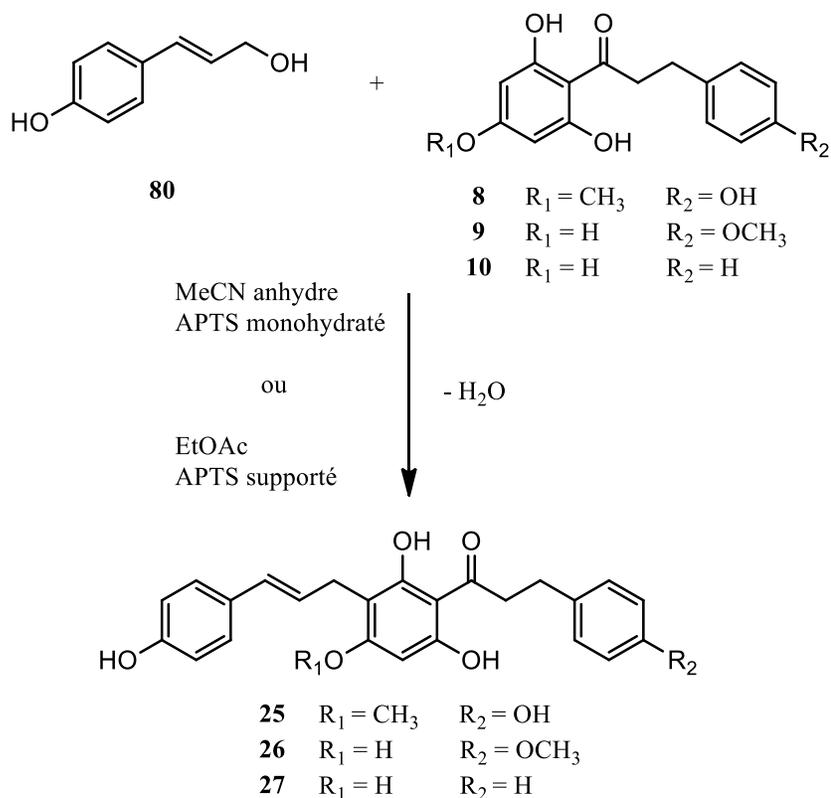


Schéma 20 : Schéma de synthèse des balsacones A, B et C (**25** à **27**)

Les rendements de la synthèse des balsacones A, B et C (**25** à **27**) sont moins intéressants que ceux précédemment rapportés, avec 54 % contre 70 % pour la balsacone A **25** et 42 % contre 51 % pour la balsacone B **26**, bien que, dans ce dernier cas, 20 % mol d'APTS aient été utilisé par Alsarraf *et al.*¹⁷ plutôt que 10 % mol. Cette différence de rendement pourrait, entre autres, s'expliquer par des conditions anhydres moins rigoureuses.

La méthode utilisée pour la synthèse de la balsacone C **27** offre également un rendement inférieur à celui de la méthode d'Alsarraf *et al.*¹⁷ (38 % contre 56 %). Cependant, dans ce cas, les deux méthodes diffèrent au niveau du solvant, du catalyseur et

de la méthode de purification utilisés. L'acétonitrile anhydre est remplacé par l'acétate d'éthyle non-anhydre, l'APTS monohydraté est remplacé par de l'APTS supporté et la purification est faite par chromatographie en phase normale (DCM/EtOAc) plutôt qu'en phase inverse (MeOH/H₂O). Comme pour la synthèse des balsacons A 25 et B 26, le fait que le solvant ne soit pas anhydre pourrait avoir une influence négative sur le rendement, en plus de la nature même du solvant, étant donné qu'Alsarraf *et al.*¹⁷ rapportent un rendement de 55 % lors de la synthèse de la balsacone A 25 après 25 h d'agitation dans l'acétate d'éthyle contre 70 % après seulement 2 h d'agitation dans l'acétonitrile. L'utilisation de l'APTS supporté pourrait aussi avoir un impact mineur sur le rendement étant donné que les billes d'APTS deviennent colorées après la réaction, ce qui témoignerait peut-être d'un phénomène d'adsorption du produit sur le polymère. Enfin, la méthode de purification en phase normale s'est révélée moins efficace, entraînant une perte mineure de produit sous forme d'un mélange de DHCc 10 et de balsacone C 27.

2.2.2 Dosage par CLHP des DHC et des balsacons dans les extraits

Les échantillons pour les analyses par CLHP ont été préparés dans le 2-propanol en raison d'un enjeu de solubilité des balsacons dans le méthanol. Les dosages ont été réalisés par une méthode d'étalonnage externe : une courbe de calibration a été produite pour chaque analyte (8 à 10 et 25 à 28) grâce à la mesure de leur absorption UV (284 nm pour les DHC et 265 nm pour les balsacons) en fonction de leur concentration. La formule de la régression linéaire a ensuite servi à déterminer la concentration de chaque analyte dans les extraits. L'erreur sur les concentrations calculées par cette méthode a été

déterminée grâce à un calcul de propagation d'erreur détaillé dans le chapitre 4 et est exprimée dans le **Tableau 3** et par les barres d'erreur présentes sur la **Figure 12**.

La **Figure 11** représente la tendance de l'évolution de l'intensité de l'absorbance (mAU*s) des DHC et des balsacones en fonction du pourcentage d'alcool utilisé. L'évolution du signal des balsacones est plutôt linéaire alors que celle des DHC a une allure parabolique puisque l'intensité des signaux diminue légèrement après 20 %m d'alcool utilisé. De plus, la teneur en DHCa **8** diminue moins rapidement que celles des DHCb **9** et DHCc **10** au fur et à mesure que la quantité d'alcool ajoutée augmente. Ce phénomène pourrait être expliqué, entre autres, par une réactivité moins importante de la DHCa **8** en raison de l'encombrement stérique provoqué par le groupe méthoxy sur le cycle A de la DHC.

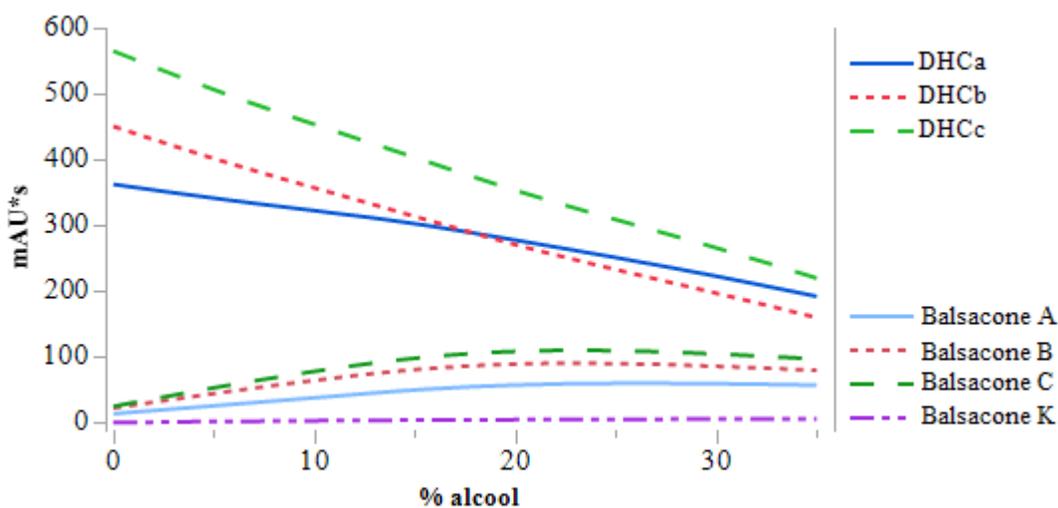


Figure 11 : Tendance de l'évolution du signal des DHC (**8** à **10**) et des balsacones (**25** à **28**) dans les extraits en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** engagé dans la réaction

Le **Tableau 3** et la **Figure 12** présentent l'évolution de la teneur en DHC (**8** à **10**) et en balsacones (**25** à **28**) en fonction du pourcentage massique (%m) d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** engagé dans la réaction d'hémisynthèse *in situ*. Globalement et comme il était anticipé, plus un pourcentage élevé d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** est utilisé, plus la teneur en DHC dans l'extrait diminue. Malgré cette tendance, les teneurs en DHCa **8** n'ont pas de différence significative entre 10 %m (**P2**) et 15 %m (**P3**) d'alcool 4-hydroxycinnamique **80**. Cette absence de différence significative est confirmée par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test HSD de Tukey ¹⁰⁶ (**Figure 13**) et pourrait être expliquée par la plus faible réactivité de la DHCa **8** comparativement aux DHCb **9** et DHCc **10**.

Tableau 3 : Dosage des DHC (**8** à **10**) et des balsacones A, B, C et K (**25** à **28**) dans les fractions **A2**, **C**, **P1** à **P6**, le brut d'extraction et le brut lavé

Echantillon	Concentration (µg/mg d'extrait)						
	DHCa 8	DHCb 9	DHCc 10	Balsacone A 25	Balsacone B 26	Balsacone C 27	Balsacone K 28
0% _{alcool} (A2)	95 ± 1	131 ± 1	169 ± 2	5,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2	6,3 ± 0,2	0
5% _{alcool} (P1)	87,5 ± 0,9	112 ± 1	145 ± 1	11,0 ± 0,3	20,3 ± 0,7	17,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2
10% _{alcool} (P2)	83,4 ± 0,9	104 ± 1	135 ± 2	12,7 ± 0,2	24,4 ± 0,3	21,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1
15% _{alcool} (P3)	82,4 ± 0,9	93 ± 1	123 ± 2	22,8 ± 0,6	38,3 ± 0,5	32,7 ± 0,4	2,16 ± 0,09
20% _{alcool} (P4)	70 ± 1	75 ± 1	100 ± 1	24,1 ± 0,5	38,6 ± 0,6	33,7 ± 0,5	3,0 ± 0,3
30% _{alcool} (P5)	59 ± 1	59 ± 1	82 ± 1	24,0 ± 0,3	36,4 ± 0,7	31,8 ± 0,7	3,2 ± 0,1
35% _{alcool} (P6)	49,4 ± 0,6	45,3 ± 0,5	63,6 ± 0,7	23,0 ± 0,4	33,4 ± 0,4	28,9 ± 0,3	3,72 ± 0,07
Brut	N/A	51,9 ± 0,5	57,9 ± 0,6	5,18 ± 0,2	42,1 ± 0,5	27,3 ± 0,4	4,9 ± 0,4
Brut lavé	22,7 ± 0,3	72,8 ± 0,8	80,2 ± 0,9	7,23 ± 0,2	57,3 ± 0,7	36,1 ± 0,5	8,5 ± 0,3
Fraction C	0	54,4 ± 0,5	16,6 ± 0,2	42,0 ± 0,4	132 ± 1	116 ± 1	0

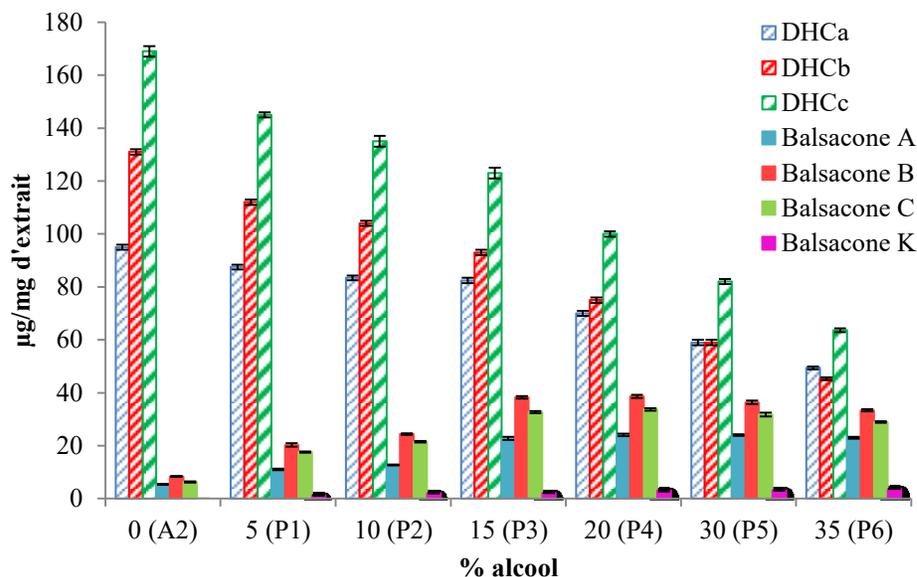


Figure 12 : Concentration en DHC (8 à 10) et en balsacones (25 à 28) dans les extraits en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagé dans la réaction

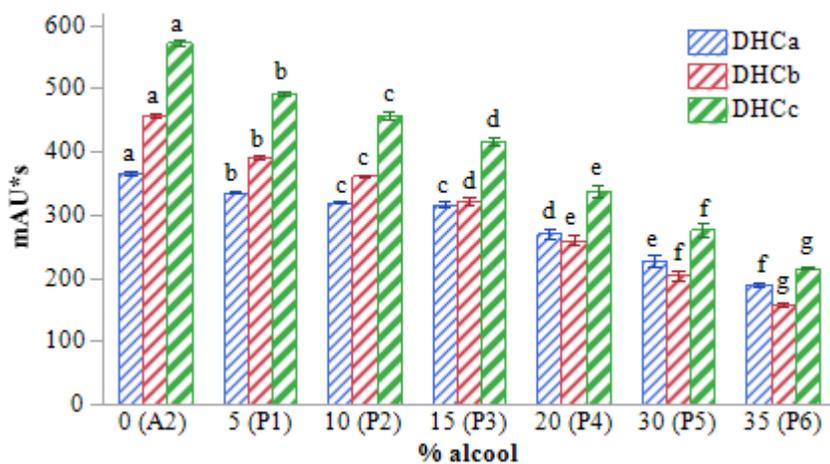


Figure 13 : Absorbance moyenne des DHC (8 à 10) dans les extraits en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagé dans la réaction. Chaque barre d'erreur est construite en utilisant un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne. Pour chaque composé différent, les groupes connectés par une même lettre ne sont pas significativement différents selon le test *posthoc* HSD de Tukey.

Les teneurs en balsacones A, B et C (25 à 27) augmentent en fonction de la quantité d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagé dans la réaction, jusqu'à atteindre un plateau vers 15 %m (**P3**) et 20 %m (**P4**) d'alcool pour ensuite diminuer. Il n'y a donc pas de différence significative au niveau de la teneur en balsacone A 25 entre 20 %m (**P4**) et 30 %m (**P5**) d'alcool, ni au niveau de la teneur en balsacone B 26 entre 15 %m (**P3**) et 20 %m (**P4**) d'alcool. La diminution de la teneur en balsacones A, B et C (25 à 27) pourrait s'expliquer par le fait que celles-ci réagissent avec l'alcool 4-hydroxycinnamique 80 présent en quantité croissante dans l'extrait pour former des balsacones plus complexes, comme par exemple la balsacone K 28 résultat d'une réaction d'alkylation-cyclisation de la balsacone A 25. Le dosage de la balsacone K 28 semble valider cette hypothèse dans la mesure où sa concentration augmente globalement en fonction de la quantité d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagée dans la réaction malgré l'absence de différences significatives entre plusieurs extraits (**Figure 14** et **Tableau 3**). Ce phénomène de polyalkylation-cyclisation des balsacones est analogue à celui présent dans la méthode d'hémisynthèse de balsacones développée par Alsarraf *et al.*¹⁷ dans laquelle un excès de DHC est utilisé afin de défavoriser la formation de balsacones complexes. Par ailleurs, et de manière analogue au cas de la DHCa 8, il est possible de remarquer que la balsacone A 25 semble aussi moins réactive que les balsacones B 26 et C 27 puisque sa teneur diminue moins rapidement que celle des deux autres (**Figure 14**).

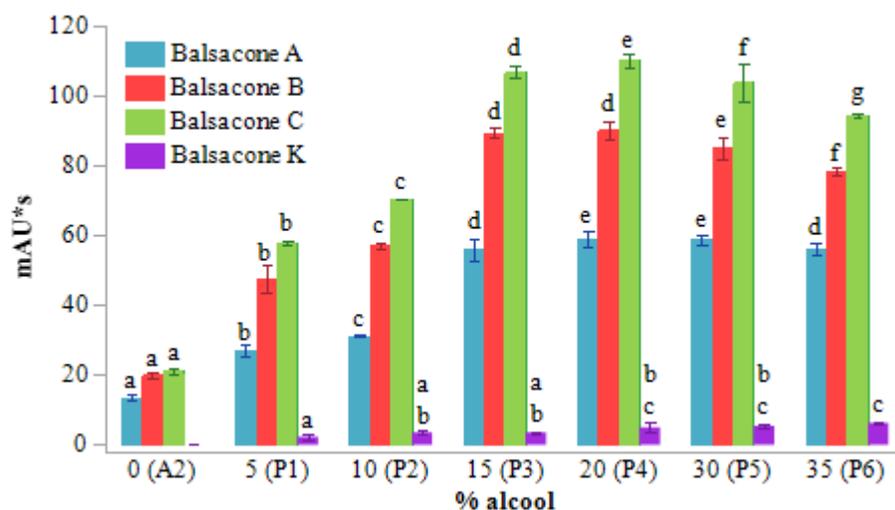


Figure 14 : Absorbance moyenne des balsacones (25 à 28) dans les extraits en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagé dans la réaction. Chaque barre d'erreur est construite en utilisant un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne. Pour chaque composé différent, les groupes connectés par une même lettre ne sont pas significativement différents selon le test *posthoc* HSD de Tukey.

La mesure de la teneur en DHCa 8 dans l'extrait brut n'est pas possible avec la méthode CLHP utilisée en raison de la présence d'un pic d'un acide organique (acide cinnamique) partiellement superposé à celui de la DHC. Le lavage du brut d'extraction avec une solution aqueuse de NaHCO₃ permet de se débarrasser des acides organiques (notamment l'acide 4-hydroxycinnamique 54 et l'acide cinnamique) et permet donc de mesurer la teneur en DHCa 8. La concentration en balsacone A 25 est probablement sous-évaluée dans l'extrait brut lavé étant donnée la fusion partielle du signal avec celui d'un composé voisin ayant un temps de rétention légèrement inférieur. À l'inverse, la concentration en balsacone A 25 est probablement légèrement surévaluée dans les extraits enrichis en balsacones (P1 à P6) en raison de la présence d'un autre signal (m/z = 389) à un temps de rétention très proche de celui de la balsacone A 25. Parallèlement, la teneur en balsacone K 28 est certainement surévalué étant donnée la présence d'un autre signal (m/z

= 587) au même temps de rétention. Ce signal pourrait correspondre à un produit de cinnamylation sur une DHC non identifiée ou sur un autre composé nucléophile ayant réagi avec l'alcool 4-hydroxycinnamique **80**.

2.2.3 Autres analyses par CLHP et CL-MS

En plus des balsacones A, B et C (**25** à **27**), les signaux **a** et **b** (**Figure 15**) ont une évolution similaire au fur et à mesure que le pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** engagé dans la réaction augmente (**Figure 16**). Suite à une analyse par CL-MS en électrospray négatif, les rapports (m/z) de l'ion moléculaire de ces composés sont de 551 (**a**) et de 521 (**b**). Ceux-ci pourraient donc être respectivement les composés **31** et **32** qui résulteraient d'une double alkylation-cyclisation en position *para* de la DHCb **9** et de la DHCc **10** puisque leur rapport (m/z) correspond à celle de la DHC +2 unités cinnamyles (**Schéma 21**).

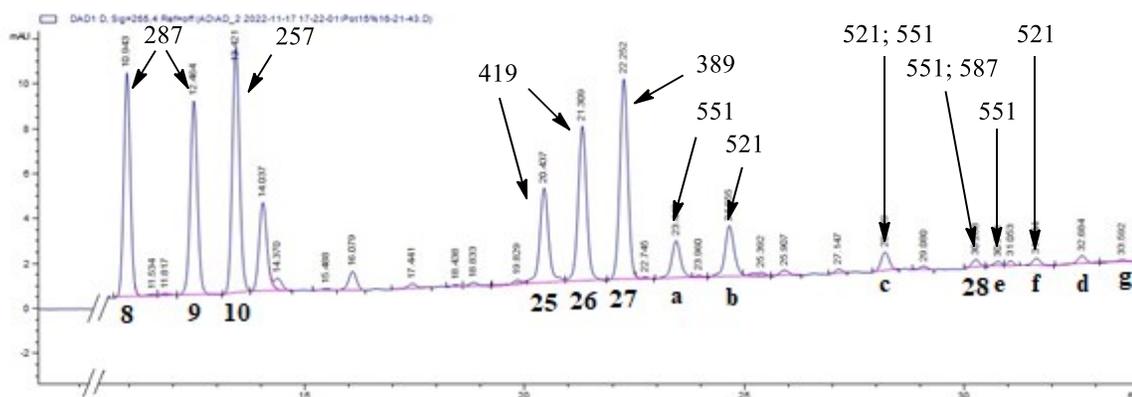


Figure 15 : Chromatogramme CLHP de l'extrait traité avec 20 %m d'alcool (**P4**) à 265 nm. Les rapports (m/z) indiquées sont communs aux extraits potentialisés (**P1** à **P6**) et à l'extrait brut lavé.

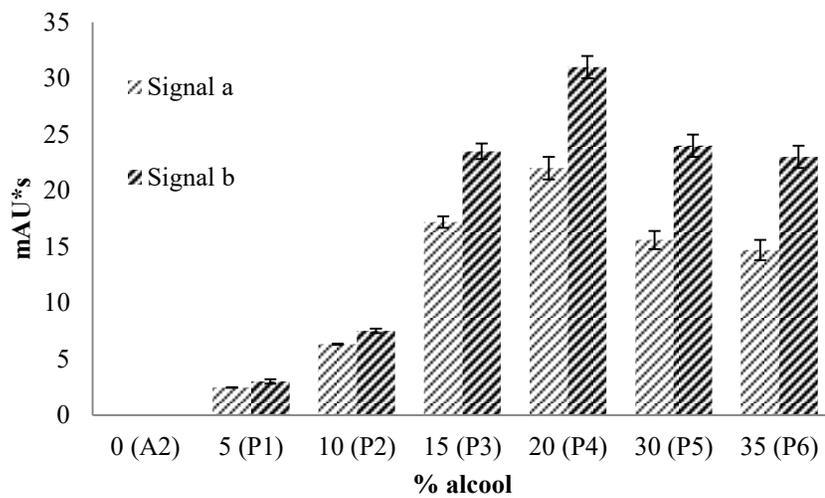


Figure 16 : Évolution de l'intensité des signaux **a** ($m/z = 551$) et **b** ($m/z = 521$) à 265 nm.
Les barres d'erreur représentent l'écart-type des mesures

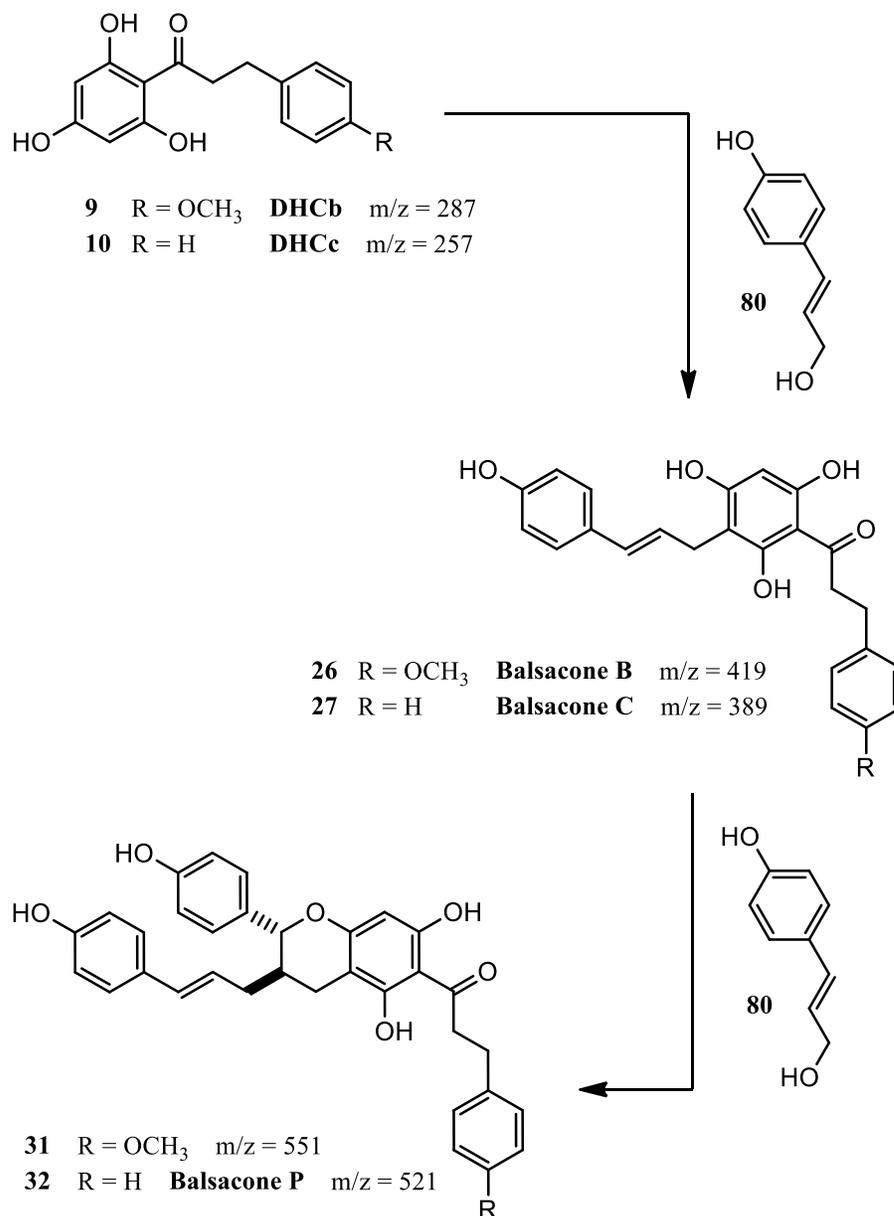


Schéma 21 : Formation des composés **31** et **32** (balsacone P)

Le composé **32** est la balsacone P rapporté par Simard *et al.*¹⁰ mais le composé **31** n'est pas rapporté dans la littérature. Cette hypothèse est tout de même renforcée par le fait qu'il n'y a pas de troisième pic qui correspondrait à une double alkylation-cyclisation en position *para* de la DHCa **8**, la cyclisation au niveau de cette position étant impossible en raison de la présence du groupe méthoxy. La stagnation ou la diminution de l'intensité des

signaux de ces deux composés à 30 %m (**P5**) et 35 %m (**P6**) d'alcool pourrait en partie s'expliquer par la formation de produits de triple alkylation (**Figure 17**) bien qu'aucun des dérivés correspondant n'ait été rapporté dans la littérature à ce jour et qu'aucune des masses correspondantes n'ait été détectée par MS. Il est également possible que la diminution des signaux des composés **31** et **32** résultent de la formation de produits de quadruple alkylation (balsacons T et U, **36a** à **37b**) déjà isolés par Simard et al.^{10, 11} et que les signaux des composés (résultant d'une triple ou d'une quadruple alkylation) soient en dessous de la limite de détection de l'appareil avec la méthode employée.

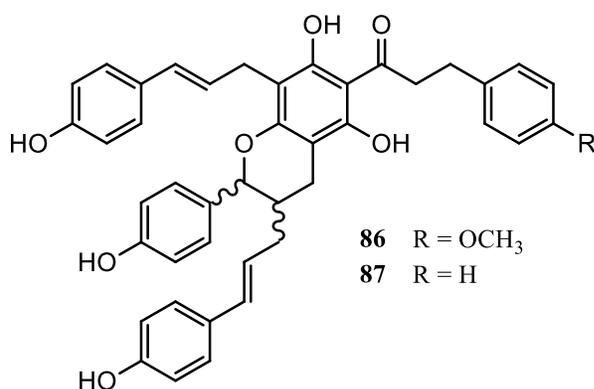


Figure 17 : Structure des composés hypothétiques **86** et **87** dont la formation expliquerait la diminution des signaux **a** et **b** dans les fractions **P5** et **P6**

Outre le cas de la balsacone K **28**, plusieurs autres signaux, notamment les signaux **c** ($m/z = 551$ et 521) et **d** (**Figure 15**), augmentent également entre 5 %m (**P1**) et 35 %m (**P6**) d'alcool utilisé (**Figure 18**). Deux masses (m/z) majoritaires se dégagent du signal **c** (551 et 521) mais aucune masse majoritaire ne se dégage du signal **d**. Là aussi, ces deux signaux pourraient correspondre à des produits de polyalkylation étant donné que l'intensité de leur signal ne cesse d'augmenter à mesure qu'un pourcentage croissant d'alcool 4-

hydroxycinnamique réagit et que leur spectre d'absorption UV est caractéristique de celui des balsacones ($\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ et 290 nm). Leur identité reste néanmoins à déterminer.

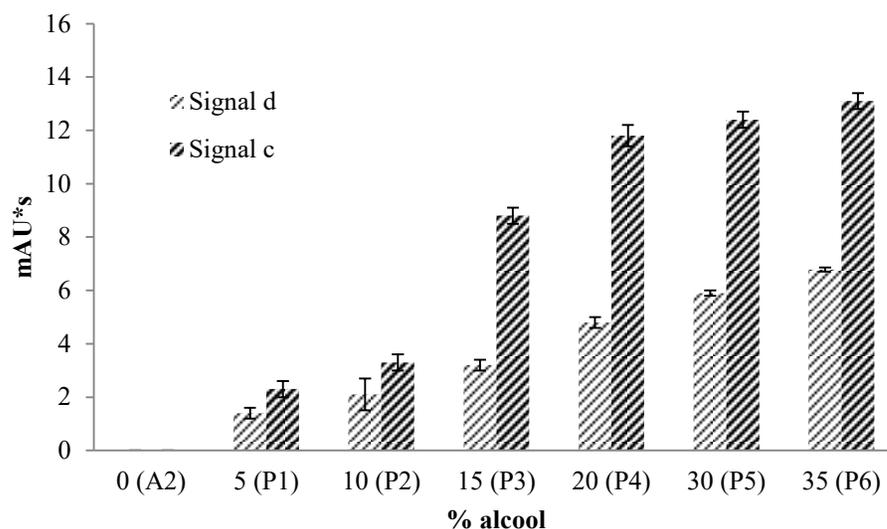


Figure 18 : Évolution de l'intensité des signaux **c** et **d** à 265 nm. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des mesures.

L'analyse CL-MS du brut d'extraction lavé et de l'extrait traité avec 20 %m (**P4**) d'alcool permet de constater que de nombreux signaux (**25** à **28** et **a**, **b**, **c**, **e** et **f**) de leurs chromatogrammes ont les mêmes temps de rétention et les rapports m/z pour leurs ions moléculaires (**Figure 15**). Tous les signaux ayant pour rapport (m/z) 521 et 551 correspondent probablement à des produits de double alkylation sur les DHC **8** à **10**. Concernant les signaux **d** et **g**, bien que des rapports (m/z) de 587 (**d**) et 557 (**g**) aient été détecté dans l'extrait traité avec 20 %m (**P4**) d'alcool, il n'a pas été possible de les détecter dans l'extrait brut lavé et aucune masse majoritaire correspondant à des produits de polyalkylations ne se dégage de ces signaux. Comme pour le rapport (m/z) de 587 présente dans le signal de la balsacone K **28**, les rapports (m/z) de 587 et 557 des signaux **d** et **g**

pourraient correspondre à des produits d'alkylation sur une DHC différente des DHCa **8**, DHCb **9** et DHCc **10**. De manière analogue à la différence de masse entre les DHC **8** et **9** (288 g/mol) et la DHC **10** (258 g/mol), la différence entre les rapports (m/z) de 587 et 557 pourrait correspondre à la présence ou non d'un groupe méthoxy sur ces composés.

Le signal **c** contient plusieurs rapports (m/z) dont deux sont en commun (521 et 551) dans le brut d'extraction lavé et l'extrait traité avec 20 %m (**P4**) d'alcool. Cependant, un troisième rapport (m/z) de 419 est présente dans le signal **c** de l'extrait traité avec 20 %m (**P4**) d'alcool. Celle-ci pourrait correspondre à un produit de cyclisation de la balsacone A **25** ou B **26**, respectivement, la balsacone F **81** ou E. De la même manière, un rapport (m/z) de 403 est présente dans le signal **c** de l'extrait brut lavé et pourrait correspondre à un analogue de balsacone formée à partir de la 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone, une autre DHC présente dans les bourgeons de peuplier baumier ⁹ mais étant à l'état de trace dans la fraction ayant servi aux potentialisations (**A2**). Cet analogue hypothétique de balsacone n'est cependant pas rapporté dans la littérature.

2.2.4 Caractère biomimétique de l'hémisynthèse

La cinnamylation directe de DHC ou d'analogues (phénols, polyphénols) par un alcool cinnamique activé sous forme protonée ou sous forme de pyrophosphate a déjà été proposée par Ollis *et al.* ^{15, 75} pour la biosynthèse de composés analogues aux balsacones. En partant de cette hypothèse, Conserva *et al.* ¹⁶ avaient même supposé l'existence de la balsacone B **26**. Le principe hémisynthétique utilisé pour produire les balsacones repose

aussi sur une cinnamylation directe des DHC en activant l'alcool 4-hydroxycinnamique en conditions acides. Étant donné que ce procédé conduit aux mêmes produits de mono et polyalkylation que ceux retrouvés dans l'extrait naturel, ceci renforce cette hypothèse biosynthétique. En effet, la comparaison des chromatogrammes CLHP de l'extrait naturel brut avec une fraction d'extrait dans laquelle l'hémisynthèse a été réalisée permet de constater que ces derniers ont le même profil chromatographique (**Figure 19**). De nombreux signaux (**a** à **g** et **28**) qui se retrouvent dans les deux matrices ont le même temps de rétention et le même spectre d'absorption UV, sauf peut-être dans le cas du signal **g** dont le spectre d'absorption UV est en majorité confondu dans le bruit de fond en raison de sa très faible concentration dans les extraits avec 5 %m (**P1**) à 35 %m (**P6**) d'alcool.

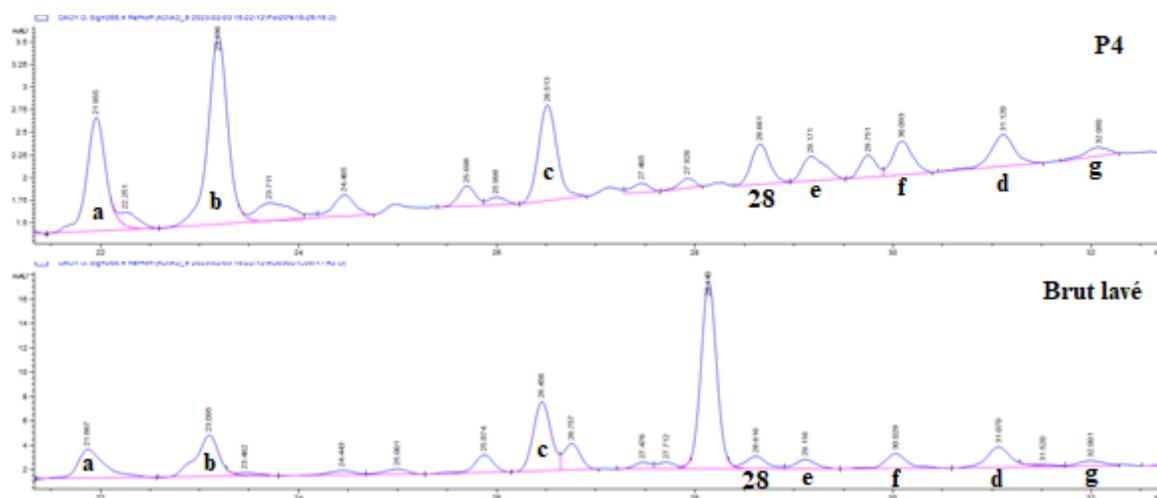


Figure 19 : Agrandissement des chromatogrammes CLHP de **P4** (en haut) et du brut d'extraction lavé (en bas) à 265 nm

Les signaux **a** à **g** et **28**, présents dans les chromatogrammes des extraits avec 5 %m (**P1**) à 35 %m (**P6**) d'alcool, sont tous absents de la fraction **A2** et correspondent donc à des produits de l'hémisynthèse *in situ* (**Figure 20**). Par ailleurs, en plus de l'isolation de la

balsacone K **28** en tant que sous-produit lors de la synthèse de la balsacone A **25**, il a été possible d'isoler la balsacone J **30** en tant que sous-produit de synthèse de la balsacone C **27** grâce à ce même procédé de cinnamylation directe en condition acide. La présence de ces deux balsacones (**28** et **30**) dans les bourgeons de peuplier baumier ¹¹ et en tant que sous-produits de synthèse abonde là aussi dans le sens de l'hypothèse biosynthétique émise par Ollis *et al.*

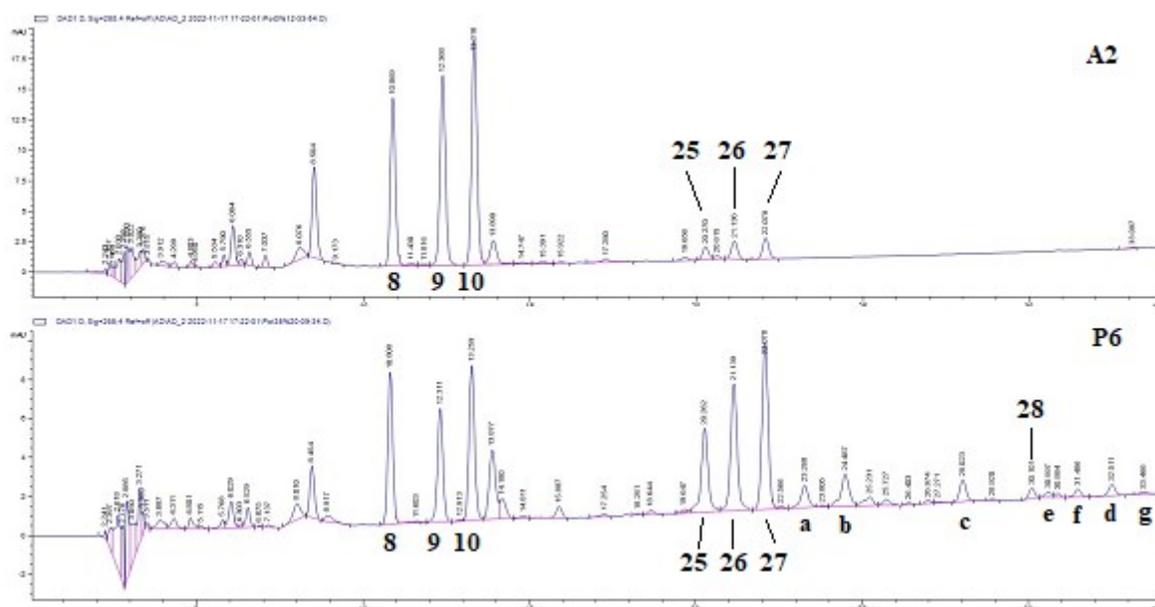


Figure 20 : Chromatogrammes CLHP de la fraction riche en DHC **A2** (en haut) et de la fraction enrichie avec 35 %m d'alcool 4-hydroxycinnamique **P6** (en bas) à 265 nm

2.3 Tests biologiques

L'activité antibactérienne des fractions obtenues par hémisynthèse *in situ* a été évaluée *in vitro* contre *E. coli*, *S. aureus* et 10 souches de SARM isolés en clinique (don du Centre intégré universitaire de santé et services sociaux (CIUSSS) du Saguenay-Lac-Saint-

Jean) ⁶⁷. L'extrait brut, la fraction naturellement riche en balsacones (fraction C) et la balsacone C 27 ont également été utilisés comme références. Les tests ont été réalisés en double (deux expériences séparées en triplicata) et les résultats sont exprimés sous forme de concentrations minimales inhibant 90 % de la croissance bactérienne (CMI₉₀).

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées afin de déterminer s'il y a une évolution significative de l'activité antibactérienne contre *S. aureus* et les SARM en fonction du pourcentage d'alcool utilisé lors des hémisynthèses. Les données de l'activité antibactérienne des extraits et des références contre *S. aureus* et *E. coli* sont présentées dans le **Tableau 4**. Aucun extrait ou composé ne semble avoir d'activité antibactérienne intéressante contre *E. coli*. Par ailleurs, la fraction riche en DHC (**A2**) semble moins active que l'extrait brut et que la fraction riche en balsacones (fraction C) contre *S. aureus*. Les hémisynthèses *in situ* (**P1** à **P6**) augmentent l'activité de la fraction riche en DHC (**A2**) sans toutefois atteindre celle de la fraction riche en balsacones (fraction C). Bien qu'aucun des extraits ne soit aussi actif que la méticilline, ce n'est pas le cas de la balsacone C 27 qui l'est contre *S. aureus*.

Tableau 4 : Activité antibactérienne ($CMI_{90} \pm SD$, $n = 3$) des extraits, de la balsacone C **27** et de la méticilline contre *S. aureus* et *E. coli*

Échantillon	Activité antibactérienne (CMI_{90} , $\mu\text{g/mL}$)		
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>
	Exp. 1	Exp. 2	
0% _{alcool} (A2)	16 \pm 1	22 \pm 2	>100
5% _{alcool} (P1)	10 \pm 1	12 \pm 1	>100
10% _{alcool} (P2)	11,4 \pm 0,8	9,2 \pm 0,8	>100
15% _{alcool} (P3)	9,8 \pm 0,9	9,0 \pm 0,4	>100
20% _{alcool} (P4)	9 \pm 2	10 \pm 1	>100
30% _{alcool} (P5)	10,0 \pm 0,6	9,4 \pm 0,6	>100
35% _{alcool} (P6)	9,7 \pm 0,6	8,6 \pm 0,6	>100
Brut	11,7 \pm 0,5	11 \pm 1	>100
Brut lavé	7,1 \pm 0,4	10 \pm 1	>100
Fraction C	7 \pm 2	5,44 \pm 0,06	>100
Balsacone C	2,2 \pm 0,3	1,9 \pm 0,3	>100
Méticilline	3,1 \pm 0,6	2,2 \pm 0,1	>50

La tendance des données de l'activité antibactérienne contre *S. aureus* montre une évolution ayant une allure de fonction radicale et celles-ci ont donc été transformées en ce sens pour la réalisation du modèle ($y' = \sqrt{y}$) (**Figure 21**). Bien que la modélisation de l'activité antibactérienne des extraits (**A2** et **P1** à **P6**) contre *S. aureus* prédite par l'ANOVA suggère une différence visuelle entre les deux expériences, il n'y a pas de différence significative entre celles-ci ($p = 0,4402$; $\alpha = 0,05$).

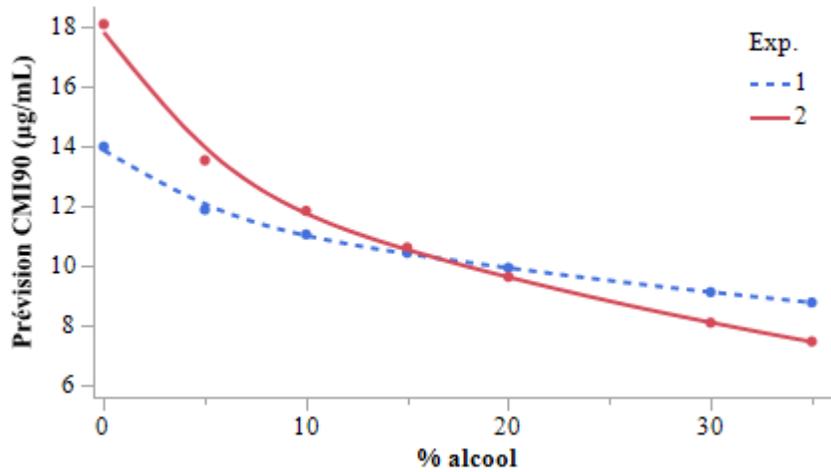


Figure 21 : Modélisation de la CMI₉₀ des extraits contre *S. aureus* en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 utilisé

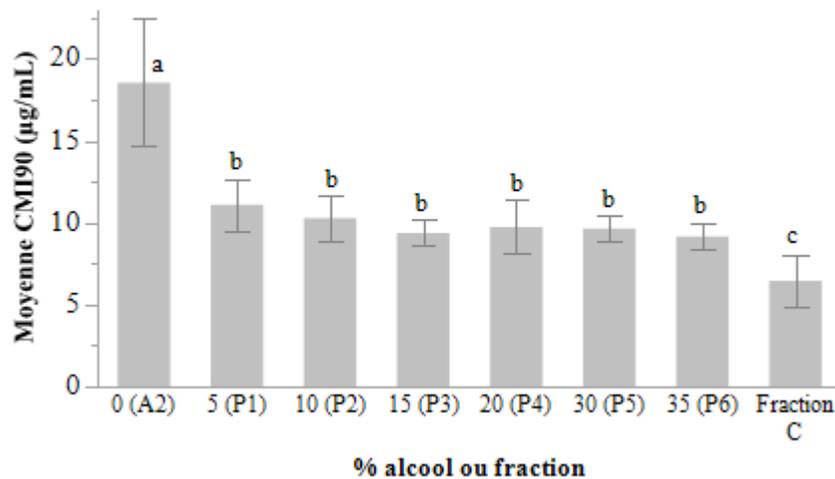


Figure 22 : Moyenne des CMI₉₀ des extraits (A2 et P1 à P6) et de la fraction C contre *S. aureus*.

Chaque barre d'erreur est construite en utilisant un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne. Les groupes connectés par une même lettre ne sont pas significativement différents selon le test *posthoc* HSD de Tukey.

La CMI₉₀ moyenne de la fraction **C** est significativement meilleure que celle des extraits enrichis (**P1** à **P6**, **Figure 22**). Ceci pourrait être dû à la concentration en balsacones largement supérieure à celle des extraits enrichis.

Les résultats de l'activité antibactérienne contre les SARM sont présentés dans le **Tableau 5**. Comme dans le cas de l'activité contre *S. aureus*, la fraction riche en DHC (**A2**) semble être la moins active de toutes contre les SARM et les hémisynthèses *in situ* améliorent cette activité en s'approchant de celle de la fraction riche en balsacones (fraction **C**) et en dépassant celle de la méticilline. La balsacone **C 27** offre la meilleure activité contre les SARM.

Échantillons	Activité antibactérienne (CMI ₉₀ , µg/mL) SARM									
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
Expérience 1										
0% _g alcool (A2)	34 ± 3	43 ± 3	44 ± 5	31 ± 6	40 ± 1	25 ± 1	22,4 ± 0,8	38 ± 8	27 ± 3	20,2 ± 0,8
5% _g alcool (P1)	20 ± 3	18 ± 4	17 ± 3	15 ± 2	17 ± 2	18 ± 4	21 ± 4	21 ± 4	16 ± 0,4	8,0 ± 0,9
10% _g alcool (P2)	18 ± 3	20 ± 2	26 ± 3	18 ± 2	15 ± 1	18,7 ± 0,9	16 ± 1	17 ± 3	22 ± 10	10 ± 2
15% _g alcool (P3)	11,6 ± 0,2	20 ± 3	12,3 ± 0,6	19 ± 5	13 ± 2	16 ± 4	14 ± 1	19 ± 1	20 ± 2	7,2 ± 0,3
20% _g alcool (P4)	12,5 ± 0,7	16 ± 5	12 ± 4	17 ± 3	11,6 ± 0,3	21 ± 5	10 ± 2	14 ± 1	8 ± 1	7,2 ± 0,1
30% _g alcool (P5)	10 ± 1	14 ± 3	14 ± 1	19 ± 2	10 ± 1	11,7 ± 0,2	9 ± 2	15 ± 3	10,6 ± 0,6	6,8 ± 0,1
35% _g alcool (P6)	11,7 ± 0,2	11,1 ± 0,8	11 ± 2	18,2 ± 0,4	11 ± 1	12,0 ± 0,7	9,3 ± 0,1	14 ± 2	11,4 ± 0,4	6,6 ± 0,1
Brut	16,8 ± 0,4	17 ± 3	24 ± 9	16 ± 2	18 ± 2	20 ± 1	13,1 ± 0,1	17 ± 1	17 ± 2	11 ± 2
Brut lavé	11,7 ± 0,3	11,5 ± 0,8	9,0 ± 0,9	15 ± 2	7,8 ± 0,5	11 ± 1	10 ± 2	15 ± 2	11,1 ± 0,8	7,2 ± 0,4
Fraction C	8,1 ± 0,2	10 ± 2	10 ± 2	8 ± 1	11,4 ± 0,1	9 ± 2	11,4 ± 0,3	11 ± 1	11,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2
Balsacone C (27)	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,6	5 ± 2	4 ± 2	3,2 ± 0,2	4,4 ± 0,3	3,5 ± 0,9	3,8 ± 0,9	4,4 ± 0,3	3 ± 1
Méticilline	16 ± 4	13 ± 3	16 ± 4	44 ± 2	22,2 ± 0,3	11 ± 1	10 ± 3	16 ± 8	11 ± 3	8 ± 4
Expérience 2										
0% _g alcool (A2)	16 ± 2	20 ± 4	20 ± 4	21 ± 2	20 ± 1	21 ± 3	20 ± 5	15 ± 1	19 ± 3	9 ± 1
5% _g alcool (P1)	16 ± 1	21 ± 3	19 ± 1	22 ± 3	16 ± 2	19 ± 3	12,56 ± 0,03	13,9 ± 0,4	18 ± 3	8 ± 2
10% _g alcool (P2)	18 ± 3	11,3 ± 0,2	14 ± 2	19,2 ± 0,6	17 ± 2	13,6 ± 0,5	12,7 ± 0,1	11,7 ± 0,2	15 ± 3	8 ± 1
15% _g alcool (P3)	11,5 ± 0,6	11 ± 2	9 ± 1	13 ± 1	10 ± 2	8 ± 1	11,9 ± 0,1	12,2 ± 0,3	9 ± 2	7,8 ± 0,9
20% _g alcool (P4)	8 ± 1	11,4 ± 0,1	10 ± 2	8 ± 1	7,3 ± 0,3	11,3 ± 0,1	8,9 ± 0,5	13,9 ± 0,2	13,0 ± 0,6	7,4 ± 0,7
30% _g alcool (P5)	8 ± 1	10 ± 2	7,31 ± 0,03	8 ± 1	9 ± 2	8,0 ± 0,8	11,9 ± 0,1	12,0 ± 0,1	12,3 ± 0,1	9 ± 2
35% _g alcool (P6)	9 ± 2	10 ± 2	10,0 ± 0,9	9 ± 2	8 ± 2	10 ± 2	11,3 ± 0,7	11,6 ± 0,1	12 ± 1	9 ± 2
Brut	15,9 ± 0,7	15,2 ± 0,2	18,4 ± 0,7	19 ± 2	17 ± 1	15,3 ± 0,9	12,9 ± 0,2	14,6 ± 0,8	15 ± 2	7,4 ± 0,6
Brut lavé	16 ± 1	16,5 ± 0,2	20 ± 3	16 ± 2	17 ± 3	21 ± 3	17 ± 6	17 ± 4	20 ± 1	7,2 ± 0,2
Fraction C	9 ± 2	9 ± 1	9,0 ± 0,9	7,6 ± 0,8	9 ± 3	8 ± 2	11,73 ± 0,01	11,5 ± 0,1	9 ± 1	9 ± 2
Balsacone C (27)	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3 ± 1	3,8 ± 0,4	4,38 ± 0,02	3,5 ± 0,8	2,41 ± 0,03	3,7 ± 0,8	3,9 ± 0,2	2,1 ± 0,3
Méticilline	13,6 ± 0,5	13 ± 2	19 ± 1	26 ± 9	23,9 ± 0,7	8,8 ± 0,7	ND	13 ± 2	10 ± 1	5 ± 2

Tableau 5 : Activité (CMI₉₀ ± SD, n = 3) des extraits, de la balsacone C **27** et de la méticilline contre dix souches de SARM

Les données utilisées pour la modélisation de l'activité antibactérienne contre les SARM ont également été transformées telles que $y' = \sqrt{y}$. Bien qu'il y ait une différence significative entre les deux expériences ($p = <0,0001$; $\alpha = 0,05$), les modélisations de l'activité antibactérienne des extraits (**A2** et **P1** à **P6**) contre les SARM gardent une tendance similaire (**Figure 23**). En effet, l'activité antibactérienne augmente rapidement dès l'utilisation de 5 %m d'alcool puis, comme dans le cas de l'activité antibactérienne contre *S. aureus*, tend vers la stagnation au niveau des pourcentages d'alcool élevés. Cependant, dans ce cas, la CMI₉₀ contre le SARM des extraits enrichis rejoint celle de la fraction C lorsqu'au moins 30 %m d'alcool est utilisé (**Figure 24**).

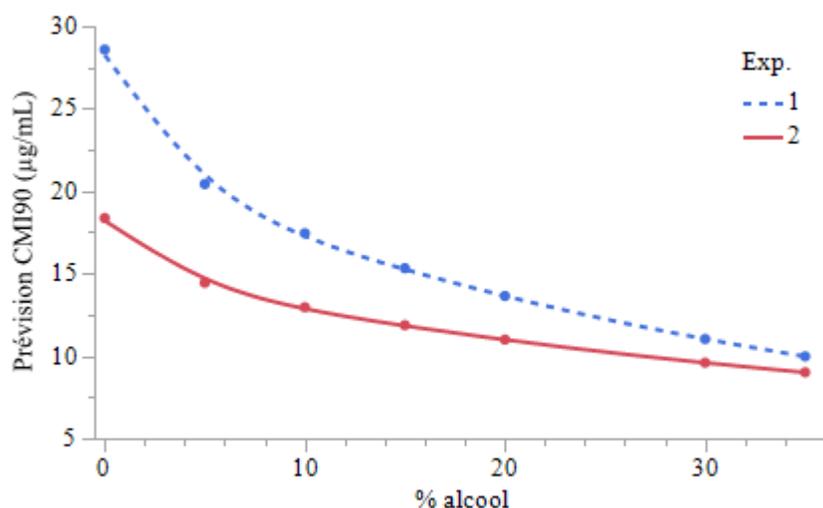


Figure 23 : Modélisation de la CMI₉₀ des extraits contre les SARM en fonction du pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique **80** utilisé

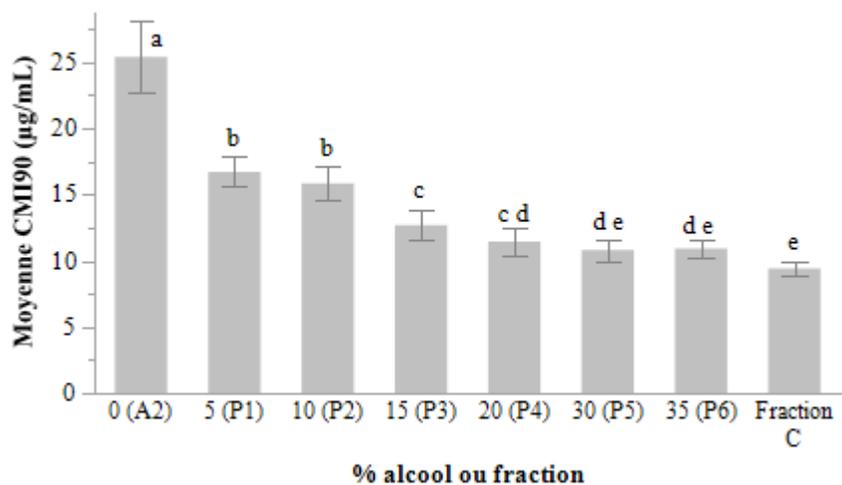


Figure 24 : Moyenne des CMI₉₀ des extraits (A2 et P1 à P6) et de la fraction C contre les SARM.

Chaque barre d'erreur est construite en utilisant un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne. Les groupes connectés par une même lettre ne sont pas significativement différents selon le test *posthoc* HSD de Tukey

Enfin, les activités antibactériennes contre le *S. aureus* et les SARM sont, dans les deux cas, significativement améliorées par le lavage de l'extrait brut ($p < 0,0001$; $\alpha = 0,05$).

Le **Tableau 6** présente la cytotoxicité des extraits contre une lignée de fibroblastes sains humains (WS1). Les résultats montrent que les échantillons ne sont pas cytotoxiques (CMI₅₀) aux concentrations efficaces contre *S. aureus* et les SARM.

Tableau 6 : Activité cytotoxique ($CI_{50} \pm SD$, $n = 3$) des extraits et de la balsacone C **27** contre les cellules des fibroblastes humains normaux (WS-1)

Échantillon	Cytotoxicité (CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$) WS1	
	Exp. 1	Exp. 2
0% _{alcool} (A2)	182 \pm 3	>100
5% _{alcool} (P1)	149 \pm 4	>100
10% _{alcool} (P2)	147 \pm 4	>100
15% _{alcool} (P3)	127 \pm 5	>100
20% _{alcool} (P4)	134 \pm 3	>100
30% _{alcool} (P5)	169 \pm 8	>100
35% _{alcool} (P6)	153 \pm 6	>100
Brut	108 \pm 2	90 \pm 9
Brut lavé	96 \pm 4	70 \pm 3
Fraction C	66 \pm 2	54 \pm 1
Balsacone C (27)	49 \pm 3	>39

CHAPITRE 3 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

3.1 Conclusion

Les balsacones A, B, C et K (25 à 28) ont été produites avec succès dans une fraction riche en DHC (8 à 10) grâce à une hémisynthèse *in situ* inspirée de la méthode développée par Alsarraf *et al.*¹⁷. Grâce à la synthèse de ces DHC et de ces balsacones, tous ces composés ont été dosés dans l'extrait brut de bourgeons de peuplier baumier et dans différentes extraits naturels ou enrichis en balsacones. De manière globale, plus le pourcentage d'alcool 4-hydroxycinnamique 80 engagé dans la réaction est élevé, plus la teneur en DHC diminue et plus la teneur en balsacones augmente, bien qu'au-delà de 20 %m d'alcool (**P4**), les teneurs en balsacones A 25, B 26 et C 27 diminuent au profit d'autres composés dont les signaux continuent de croître. Parallèlement à la diminution des teneurs en balsacones simples, deux autres signaux importants (**a** et **b**) ont la même évolution après 20 %m d'alcool (**P4**) utilisé. L'analyse de leur masse par CL-MS permet de supposer qu'il s'agit de balsacones complexes (31 et 32) issues d'un phénomène de double alkylation-cyclisation en position *para* sur la DHCb et la DHCc (9 et 10).

Les profils chromatographiques CLHP de l'extrait brut et des hémisynthèses *in situ* (**P1** à **P6**) sont similaires et, en plus des balsacones 25 à 28, au moins sept signaux (**a** à **g**) y sont retrouvés en commun. Ces signaux correspondent à des sous-produits de réaction et sont probablement, au moins en partie, d'autres balsacones complexes, leur spectre d'absorption UV et leur rapport (m/z) étant caractéristique de ceux des balsacones. Ce

phénomène est en accord avec l'hypothèse émise par Ollis *et al.*^{15, 75} sur la biosynthèse des cinnamylphénols par la réaction entre un alcool cinnamique activé et un phénol.

Globalement, les hémisynthèses *in situ* (**P1** à **P6**) augmentent l'activité antibactérienne de la fraction riche en DHC (**A2**). Les activités antibactériennes contre *S. aureus* et les SARM des extraits enrichis ont une allure de fonction radicale et augmentent en fonction du pourcentage d'alcool engagé dans l'hémisynthèse jusqu'à atteindre un plateau. Contre *S. aureus*, l'activité biologique stagne rapidement dès 5 %m d'alcool utilisé alors que contre les SARM, l'activité continue légèrement d'augmenter au fil des pourcentages d'alcool croissants jusqu'à rejoindre celle de la fraction C naturellement riche en balsacones.

3.2 Perspectives

Les perspectives de ce projet sont nombreuses. Les extraits végétaux sont utilisés dans de multiples domaines et l'amélioration de leurs propriétés biologiques pourrait favoriser leur valorisation. Ainsi, le principe d'hémisynthèse *in situ* pourrait être transposé à d'autres matrices végétales riches en DHC (e.g. *K. angustifolia*) dans le but de produire des extraits enrichis en balsacones qui pourraient être utilisés tels quels ou dont les balsacones pourraient être isolées plus facilement que ne le sont les DHC précurseurs.

Parallèlement à la recherche de nouvelles matrices dans lesquelles transposer cette méthode d'hémisynthèse, il serait intéressant d'y incorporer l'utilisation d'alcools

allyliques naturels autres que l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** tels que, par exemple, l'alcool coniférylique ou l'alcool sinapylique, afin de produire des extraits enrichis en une variété d'analogues de balsacones et présentant potentiellement des activités biologiques intéressantes.

Il pourrait également être intéressant de poursuivre le développement et l'optimisation de l'extraction de l'asébotine **7** et/ou de la DHC correspondante **8** à partir de *K. angustifolia* étant donné leur abondance et celle de la plante. Une méthode simple et robuste de production de DHCa **8** à partir de *K. angustifolia* permettrait, par la suite, d'avoir facilement et à moindre coût, accès aux balsacones A **25** et K **28**.

D'un point de vue analytique, il serait judicieux de s'assurer de la nature des composés correspondant aux signaux **a** et **b** sur les chromatogrammes CLHP en les isolant et en validant leur structure par des analyses par RMN. Ceci permettrait de caractériser au moins une nouvelle balsacone hypothétique **31** jamais rapportée dans la littérature.

CHAPITRE 4

PARTIE EXPERIMENTALE

4.1 Informations générales

Les solvants usuels (grade ACS) utilisés ont été fournis par Fisher Scientific et les solvants anhydres l'ont été par Sigma-Aldrich. Les différents réactifs et catalyseurs ont également été fournis par Sigma-Aldrich ou Alfa Aesar. Les plaques CCM, fournies par Silicycle ou Sigma-Aldrich, sont en aluminium et recouvertes d'un gel de silice phase normale 60 F₂₅₄ ou d'un gel de silice phase inverse 60 RP-18 F_{254s}. Les CCM ont été analysées sans révélateur sous lumière UV (254 nm ou 365 nm) ou avec révélateur (CAM ou H₂SO₄ 20 % dans MeOH) à la lumière du jour. Après chauffage, les DHC apparaissent jaunes une fois révélées au H₂SO₄ ou au CAM sans chauffage et les balsacones apparaissent oranges après chauffage avec H₂SO₄ ou rouge-mauves avec CAM sans chauffage. Les purifications chromatographiques sur silice en phase inverse ont été faites sur un système automatisé de chromatographie liquide à basse pression Büchi Pure C-815 Flash avec des colonnes de silice C-18 Büchi FlashPure.

4.1.1 Analyses spectrales et chromatographiques

Les analyses CLHP ont été réalisées sur un système CLHP Agilent 1260 Infinity II équipé d'un détecteur UV-DAD réglé à 265 et 284 nm. Les analyses CL-SM ont été réalisées sur un système CLHP Agilent 1260 Infinity II équipé d'un détecteur UV-Vis et d'un spectromètre de masse Agilent InfinityLab LC/MSD iQ à système d'ionisation ESI (ionisation négative). Pour ces deux types d'analyse, une colonne CLHP Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 × 250mm, 5 µm) a été utilisée avec un débit de solvant de 1 mL/min et le volume d'injection était de 1 µL. Le **Tableau 7** décrit le gradient de solvant utilisé pour les analyses CLHP et CL-MS.

Tableau 7 : Gradient de solvant utilisé pour les analyses CLHP et CL-SM

Temps (min)	% H ₂ O	% MeOH
0	40	60
40	5	95
46	5	95
50	40	60
75	40	60

Dans le cadre du dosage des DHC et des balsacones dans les extraits, les solutions mères d'extraits et de standards ont été préparées dans l'alcool isopropylique (IPA) et dans des fioles jaugées de 10,00 mL. Les dilutions en série ont été réalisées avec une micropipette électronique à déplacement positif Eppendorf Repeater E3. Les standards ont servi à réaliser des courbes de calibration (étalonnage externe) avec des concentrations d'analytes allant globalement de 250 à 3,50 $\mu\text{g/mL}$ ou, dans le cas de la balsacone K **28**, de 10,5 à 0,656 $\mu\text{g/mL}$. Des analyses de variance (ANOVA) avec un intervalle de confiance de 95 % ($\alpha = 0,05$) ont été réalisées sur les résultats des dosages par CLHP afin de s'assurer qu'il y ait une évolution significative des teneurs des DHC et des balsacones. En l'absence d'autre précision, les incertitudes et les barres d'erreurs présentes dans les graphiques et les tableaux des dosages sont exprimées grâce au calcul de la propagation des erreurs tel que :

$$E\%_{\mu\text{g/mL}} = \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\sigma_{\text{mesures}}^2 + \sigma_b^2}}{(\bar{x}_{\text{mesures}} - b)} \times 100\right)^2 + \left(\frac{\sigma_m}{m} \times 100\right)^2}$$

Où $E\%_{\mu\text{g/mL}}$ représente l'erreur relative sur la concentration en $\mu\text{g/mL}$ d'un composé calculée grâce à l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = mx+b$); σ représente l'écart-type et \bar{x} représente la moyenne.

$$E\%_{\text{mg/mL}} = \sqrt{\left(\frac{E_{\text{masse}}}{\text{masse}} \times 100\right)^2 + \left(\frac{E_{\text{volume}}}{\text{volume}} \times 100\right)^2}$$

Où $E\%_{\text{mg/mL}}$ représente l'erreur relative sur la concentration de l'échantillon préparé; E_{masse} représente l'erreur instrumentale sur la pesée ($\pm 0,0001$ g) et E_{volume} représente l'erreur instrumentale sur la préparation de la solution avec une fiole jaugée de 10,00 mL ($\pm 0,02$ mL).

$$E\%_{\mu\text{g/mg}} = \sqrt{(E\%_{\mu\text{g/mL}})^2 + (E\%_{\text{mg/mL}})^2}$$

$$E_{\mu\text{g/mg}} = x \frac{E\%_{\mu\text{g/mL}}}{100}$$

Où $E_{\mu\text{g/mg}}$ représente l'erreur absolue sur la teneur calculée x .

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre RMN Bruker Ascend 500 MHz ou sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400 MHz en utilisant des solvants deutérés appropriés ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ou MeOD). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm en utilisant le signal du tétraméthylsilane (TMS) comme référence. En absence de TMS, la référence utilisée est le pic résiduel du solvant (MeOD : $\delta_{\text{H/C}}$ 3,31/49,0¹⁰⁷). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz) et les multiplicités des signaux sont abrégées telles que suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet).

4.1.2 Matériel végétal

Les bourgeons de *P. balsamifera* et les parties aériennes de *K. angustifolia* proviennent du Saguenay-Lac-Saint-Jean, Québec, Canada.

4.2 Extraction et fractionnement de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera*

Les bourgeons de *P. balsamifera* entiers (50 g) ont été extraits avec 250 mL d'éthanol 95 % trois fois pendant 1 h à reflux. La matière solide a été filtrée (filtre Whatman #4) et le solvant du filtrat a été évaporé pour obtenir un extrait humide. Cet extrait a été suspendu dans l'eau et transféré dans un contenant adéquat pour être lyophilisé jusqu'à obtention d'un résidu sec (22 g). Une partie de cet extrait (16 g) a été fractionné sur une colonne de résine synthétique apolaire adsorbante (Diaion HP20) avec des mélanges EtOH/H₂O (3 VM EtOH 60 %, 5 VM EtOH 70 %, 4 VM EtOH 80 %, 4 VM EtOH 95 %, puis 4 VM EtOAc). Huit fractions ont ainsi été obtenues (fractions **A** à **H**) et une partie des fractions **A** et **B** a été lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ pour donner les fractions **A2** et **B2** (Schéma 22).

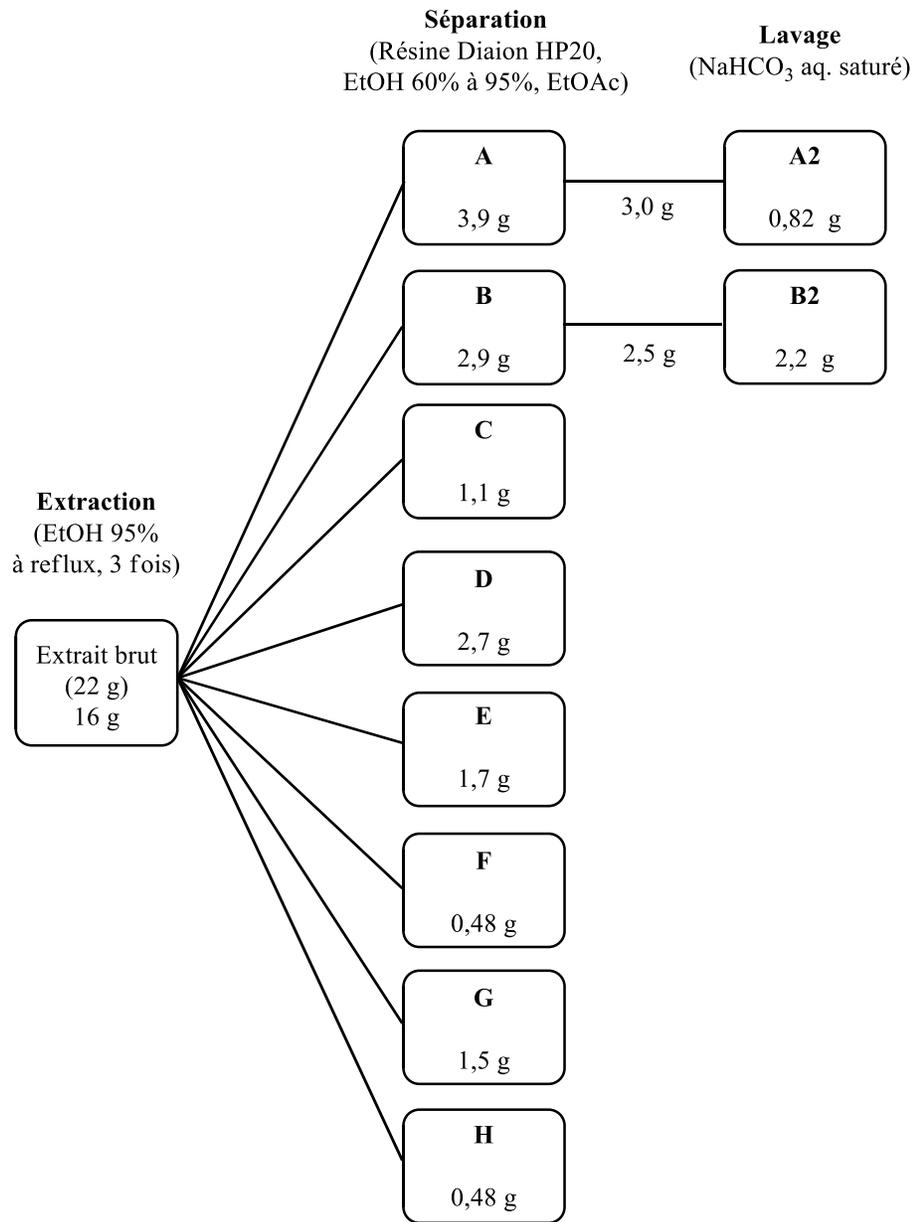


Schéma 22 : Schéma de fractionnement des bourgeons de *P. balsamifera*

4.3 Synthèse de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80**

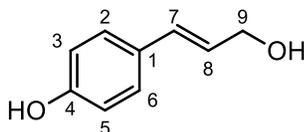


Figure 25 : Structure de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80**

L'acide 4-hydroxycinnamique **54** (1,69 g ; 10,3 mmol) a été placé dans un ballon et sous atmosphère d'argon puis 40 mL de méthanol anhydre suivi de l'APTS monohydraté (0,392 g ; 2,06 mmol) ont été ajoutés. La réaction a été réalisée à reflux pendant 5 h et a été suivie par CCM en phase normale (hexanes/EtOAc 7:3). Le méthanol a ensuite été évaporé et le résidu a été dissout dans 50 mL d'acétate d'éthyle pour être lavé avec trois fois 50 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée avec Na₂SO₄ et évaporée jusqu'à l'obtention du méthyl 4-hydroxycinnamate **55** sous forme d'une poudre blanche (1,80 g ; *R_f* = 0,38 ; *R* = 98 %).

Le méthyl 4-hydroxycinnamate **55** (1,80 g ; 10,1 mmol) a été placé dans un ballon surmonté d'une ampoule à addition isobare. Le montage a été placé sous atmosphère d'argon et 100 mL de toluène ont été ajoutés. Sur 30 min, 43 mL de DIBAL-H 1 M (40,3 mmol) ont ensuite été ajoutés au goutte-à-goutte par l'ampoule à addition tout en maintenant le réacteur à 0 °C. Le mélange a été agité pendant 1 h à 0 °C et le suivi de la réaction a été fait par CCM en phase normale (hexanes/EtOAc 7:3). La réaction a été arrêtée par l'ajout de 10 mL de méthanol au goutte-à-goutte par l'ampoule à addition à TA. Par la suite, 50 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl ont été ajoutés. De l'eau a été ajoutée et le mélange a été extrait avec trois portions de 160 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique a ensuite été séchée avec Na₂SO₄ et évaporée jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Ce résidu a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne (hexanes/EtOAc 100:0 à 65:35) pour l'obtention de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** sous forme d'une poudre blanche (1,28 g ; *R_f* = 0,10 ; *R* = 85 % ; **Figure 25**). RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 7,24 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H-2/H-6) ; 6,72 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H-3/H-5) ; 6,50 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H-7) ; 6,16 (dt, *J* = 15,8 ; 5,9 Hz, 1H, H-8) ; 4,18 (dd, *J* = 5,9 ; 1,1 Hz, 2H, H-9). RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ 158,3 (C-4) ; 131,9 (C-7) ; 130,0 (C-1) ; 128,7 (C-2/C-6) ; 126,6 (C-8) ; 116,3 (C-3/C-5) ; 64,0 (C-9). Les données spectrales RMN ¹H et ¹³C sont en accord avec celles de la littérature ¹⁰⁸.

4.4 Production de la DHCa **8**

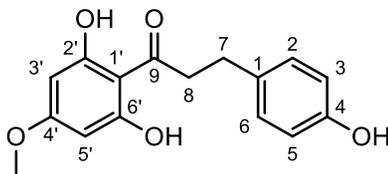


Figure 26 : Structure de la DHCa **8**

Trois extractions de parties aériennes séchées et broyées de *K. angustifolia* (101 g) ont été réalisées dans l'éthanol 95 % à reflux pendant 90 min. Les extraits combinés ont ensuite été évaporés jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (38,1 g). L'extrait sec a ensuite été suspendu dans l'eau, lavé au dichlorométhane (3 fois 200 mL) puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (2 fois 200 mL). La phase organique (EtOAc) a été séchée avec du Na₂SO₄ puis évaporée jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (15 g). Cet extrait a ensuite été séparé par chromatographie sur colonne en phase inverse (résine synthétique apolaire adsorbante Diaion HP20) avec des mélanges MeOH/H₂O (5 VM MeOH 20 %, 5 VM MeOH 50 %, 2 VM MeOH 100 %, puis 1 VM EtOAc). Le suivi du fractionnement a été fait par CCM (CHCl₃/MeOH/H₂O 55:15:1) révélée avec H₂SO₄ 20 % dans du méthanol. Les fractions riches en asébotine (**7**) (*R_f* = 0,52) ont été réunies et évaporés. L'extrait a ensuite été séparé par chromatographie sur colonne en phase normale avec des mélanges CHCl₃/MeOH (2 VM MeOH 0 %, 1 VM MeOH 6 %, 7 VM MeOH 10 %). Les fractions riches en asébotine **7** ont été réunies et évaporées jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (1,93 g).

La fraction riche en asébotine **7** (1,93 g) a ensuite été solubilisée dans 12 mL de l'éthanol 95 % et hydrolysée en présence de 17 mL HCl 3N pendant 2 h à reflux. Une fois la réaction complétée, le mélange a été neutralisé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ et l'éthanol a été évaporé. L'extrait aqueux a ensuite été extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 50 mL) et la phase organique a été séchée avec Na₂SO₄ puis. L'extrait a enfin été purifié par chromatographie sur colonne en phase normale avec des mélanges CHCl₃/MeOH (3 VM MeOH 0 %, 3 VM MeOH 3 %, 2 VM MeOH 5 %). Les fractions d'intérêt ont été réunies et évaporées jusqu'à l'obtention de la DHCa **8** sous forme de cristaux blanchâtres (589 mg ; 0,58 %m de la masse de matière végétale sèche ; **Figure 26**). RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 7,05 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H-2/H-6) ; 6,70 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H-3/H-5) ; 5,92 (s, 2H, H-3'/H-5') ; 3,77 (s, 3H, 4'-OMe) ; 3,31 – 3,27 (m, 2H, H-8) ; 2,87 – 2,83 (m, 2H, H-7). RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ 206,7 (C-9) ; 167,5 (C-4') ; 165,7 (C-2'/C-6') ; 156,5 (C-4) ; 133,9 (C-1) ; 130,3 (C-2/C-6) ; 116,1 (C-3/C-5) ; 106,0 (C-1') ; 94,3 (C-3'/C-5') ; 55,8 (4'-OMe) ; 47,4 (C-8) ; 31,3 (C-7). Les données spectrales RMN ¹H et ¹³C sont en accord avec celles de la littérature ⁹.

4.5 Synthèse de la DHCb 9 et de la DHCc 10

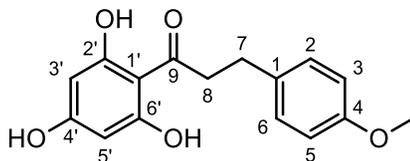


Figure 27 : Structure de la DHCb 9

DHCb 9 : L'acide 3-(4-méthoxyphényl)propionique (1,46 g ; 8,10 mmol) et le dihydrate de phloroglucinol (1,68 g ; 8,10 mmol) ont été placés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et le montage a été placé sous atmosphère d'argon. Le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (5 mL ; 40,5 mmol) a ensuite été ajouté et le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h à 85 °C. La réaction a été suivie par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel a été versé dans 100 mL d'une solution aqueuse de NaOAc 10 % et le tout a été agité pendant 4 h. La phase aqueuse a été extraite avec trois portions de 100 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique a ensuite été lavée avec 100 mL de H_2O puis 100 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl. Le solvant a été évaporé et le résidu a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne en phase normale (DCM/MeOH 100:0 à 97:3) puis par chromatographie sur colonne en phase inverse (MeOH/ H_2O 45:55 à 100:0) pour obtenir la DHCb 9 sous forme de solide brun (299 mg ; R = 13 % ; **Figure 27**). RMN ^1H (500 MHz, MeOD) : δ 7,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2/H-6) ; 6,82 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3/H-5) ; 5,81 (s, 2H, H-3'/H-5') ; 3,75 (s, 3H, 4-OMe) ; 3,29 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-8) ; 2,88 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-7). RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) : δ 206,2 (C-9) ; 166,4 (C-4') ; 165,9 (C-2'/C-6') ; 159,4 (C-4) ; 135,2 (C-1) ; 130,3 (C-2/C-6) ; 114,8 (C-3/C-5) ; 105,3 (C-1') ; 95,8 (C-3'/C-5') ; 55,7 (4-OMe) ; 47,1 (C-8) ; 31,4 (C-7). Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles de la littérature ⁹.

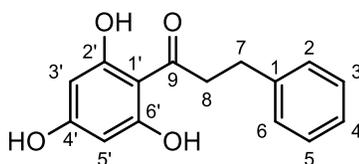


Figure 28 : Structure de la DHCc 10

DHCc 10 : L'acide 3-phénylpropionique (1,22 g ; 8,10 mmol) et le dihydrate de phloroglucinol (1,68 g ; 8,10 mmol) ont été placés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et le montage a été placé sous atmosphère d'argon. Le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (5 mL ; 40,5 mmol) a ensuite été ajouté et le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h à 85 °C. La réaction a été suivie par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel a été versé dans 100 mL d'une solution aqueuse de NaOAc 10 % et le tout a été agité pendant 4 h. La phase aqueuse a été extraite avec trois portions de 100 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique a ensuite été lavée avec 100 mL de H_2O puis 100 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl. Le solvant a été évaporé et le résidu a ensuite été purifié

par chromatographie sur colonne en phase normale (CHCl₃/MeOH 100:0 à 98:2) pour obtenir la DHCC **10** sous forme de solide blanc (191 mg ; R = 11 % ; **Figure 28**). RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 7,30 – 7,20 (m, 4H, H-2/H-6; H-3/H-5) ; 7,17 – 7,13 (m, 1H, H-4) ; 5,81 (s, 2H, H-3'-H-5') ; 3,36 – 3,32 (m, 2H, H-8) ; 2,99 – 2,90 (m, 2H, H-7). RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : 206,1 (C-9) ; 166,2 (C-4') ; 165,8 (C-2'/C-6') ; 143,2 (C-1) ; 129,4 (C-2/C-6) ; 129,4 (C-3/C-5) ; 126,9 (C-4) ; 105,3 (C-1') ; 95,73 (C-3'-C-5') ; 46,9 (C-8) ; 32,2 (C-7). Les données spectrales RMN ¹H et ¹³C sont en accord avec celles de la littérature⁹.

4.6 Synthèse des balsacones **25** à **28**

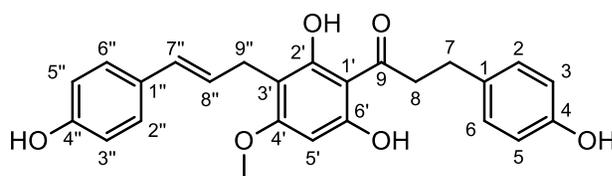


Figure 29 : Structure de la balsacone A **25**

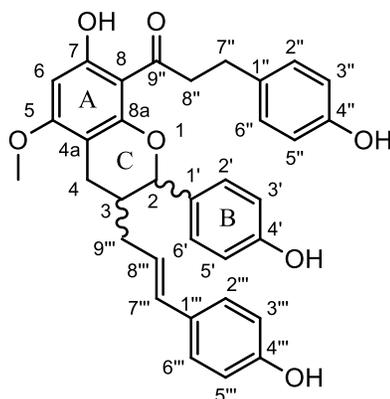


Figure 30 : Structure de la balsacone K **28**

Balsacone A **25** et balsacone K **28** : L'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (11,8 mg ; 78,4 μmol) et la DHCC **8** (90,4 mg ; 314 μmol) ont été placés dans un ballon sous atmosphère d'argon. Les réactifs ont été mis en solution avec de l'acétonitrile anhydre et une solution d'APTS monohydraté (10 % mol) dans de l'acétonitrile anhydre y a été ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h à TA et le suivi de la réaction a été fait par CCM en phase inverse (MeOH/H₂O 85:15). Une fois la réaction terminée, un volume d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ a été ajouté et le mélange a été extrait avec quatre portions d'acétate d'éthyle. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ et le solvant a été évaporé pour donner un résidu sec. Le résidu a ensuite été purifié sur colonne en phase inverse (MeOH/ H₂O 50:50 à 90:10 sur 1 h). Le composé purifié a été suspendu dans l'eau

et lyophilisé. La balsacone A **25** a été obtenue sous une forme de poudre blanchâtre (17,8 mg ; R = 54 % ; **Figure 29**) et la balsacone K **28** a été obtenue sous une forme de poudre brune (5,3 mg ; R = 12 % ; **Figure 30**). Balsacone A **25** : RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : δ 13,66 (s, 1H, C-2'-OH) ; 7,17 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2''/H-6'') ; 7,10 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H-2/H-6) ; 6,75 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H, H-3/H-5) ; 6,74 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-3''/H-5'') ; 6,31 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-7'') ; 6,17 (s, 1H, H-5') ; 6,15 – 6,07 (m, 1H, H-8'') ; 3,84 (s, 3H, 4'-OMe) ; 3,43 – 3,33 (m, 4H, H-9'' ; H-8) ; 2,91 – 2,88 (m, 2H, H-7). RMN ^{13}C (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : δ 206,2 (C-9) ; 164,4 (C-4'') ; 163,8 (C-2') ; 161,5 (C-6') ; 157,4 (C-4') ; 156,4 (C-4) ; 133,5 (C-1) ; 130,6 (C-1'') ; 130,2 (C-2/C-6) ; 130,1 (C-7) ; 127,9 (C-2''/C-6'') ; 126,2 (C-8'') ; 116,1 (C-3/C-5) ; 116,0 (C-3''/C-5'') ; 107,6 (C-3') ; 105,5 (C-1') ; 91,4 (C-5') ; 56,0 (4'-OMe) ; 47,2 (C-8) ; 30,6 (C-7) ; 26,1 (C-9''). Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles de la littérature ⁹. Balsacone K **28** : RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : δ 13,88 (s, 1H, 7-OH) ; 8,68 (s, 1H, Ar-OH) ; 8,43 (s, 1H, Ar-OH) ; 8,11 (s, 1H, Ar-OH) ; 7,38 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2'/H-6') ; 7,22 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2'''/H-6''') ; 6,93 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3'/H-5') ; 6,77 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3'''/H-5''') ; 6,64 (s, 4H, H-3''/H-5'' ; H-2''/H-6'') ; 6,31 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-7''') ; 6,09 (s, 1H, H-6) ; 6,00 – 6,04 (m, 1H, H-8''') ; 4,85 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, H-2) ; 3,87 (s, 1H, 5-OMe) ; 3,22 – 3,07 (m, 2H, H-8'') ; 2,87 – 2,83 (m, 1H, H-4) ; 2,74 – 2,71 (m, 2H, H-7'') ; 2,36 (dd, $J = 16,3$; 10,7 Hz, 1H, H-4) ; 2,32 – 2,24 (m, 1H, H-3) ; 2,17 – 2,22 (m, 1H, H-9''') ; 1,98 – 2,04 (m, 1H, H-9'''). RMN ^{13}C (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) : δ 206,0 (C-9'') ; 166,5 (C-7) ; 164,6 (C-5) ; 158,7 (C-4') ; 158,3 (C-8a) ; 157,7 (C-4''') ; 156,3 (C-4'') ; 132,7 (C-1'') ; 132,7 (C-7''') ; 131,0 (C-1') ; 130,1 (C-1''') ; 129,8 (C-2'/C-6') ; 129,8 (C-2''/C-6'') ; 128,2 (C-2'''/C-6''') ; 124,5 (C-8''') ; 116,4 (C-3'/C-5') ; 116,2 (C-3'''/C-5''') ; 115,9 (C-3''/C-5'') ; 105,9 (C-8) ; 102,9 (C-4a) ; 92,8 (C-6) ; 84,1 (C-2) ; 56,3 (5-OMe) ; 46,2 (C-8'') ; 37,8 (C-3) ; 36,2 (C-9''') ; 30,5 (C-7'') ; 25,9 (C-4). Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles de la littérature ¹¹.

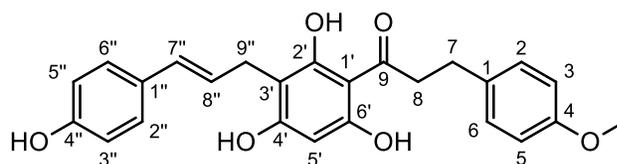


Figure 31 : Structure de la balsacone B **26**

Balsacone B **26** : L'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (19,0 mg ; 127 μmol) et la DHCb **9** (146 mg ; 507 μmol) ont été placés dans un ballon sous atmosphère d'argon. Les réactifs ont été mis en solution avec de l'acétonitrile anhydre et une solution d'APTS monohydraté (10 % mol) dans de l'acétonitrile anhydre y a été ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h à TA et le suivi de la réaction a été fait par CCM en phase inverse (MeOH/H₂O 85:15). Une fois la réaction terminée, un volume d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ a été ajouté et le mélange a été extrait avec quatre portions d'acétate d'éthyle. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ et le solvant a été évaporé pour donner un résidu sec. Le résidu a ensuite été purifié sur colonne en phase inverse (MeOH/ H₂O 50:50 à 90:10 sur 1 h). Le composé purifié a été suspendu dans l'eau et lyophilisé. La balsacone B **26** a été obtenue sous une forme de poudre blanchâtre à brune (22,1 mg ; R = 42 % ; **Figure**

31). RMN ^1H (500 MHz, MeOD) : δ 7,13 (d, 2H, C-2/C-6) ; 7,12 (d, 2H, C-2''/C-6'') ; 6,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-3/H-5) ; 6,67 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-3''/H-5'') ; 6,26 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-7'') ; 6,10 (dt, $J = 15,6$; 6,1 Hz 1H, H-8'') ; 5,94 (s, 1H, H-5') ; 3,74 (s, 3H, 4-OMe) ; 3,36 (d, $J = 5,9$ Hz, H-9'') ; 3,28 (2H, H-8) ; 2,89 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-7). RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) : δ 206,4 (C-9) ; 165,1 (C-2') ; 163,9 (C-4') ; 161,8 (C-6') ; 159,4 (C-4) ; 157,3 (C-4'') ; 135,2 (C-1) ; 131,3 (C-1'') ; 130,3 (C-2/C-6) ; 130,1 (C-7'') ; 128,1 (C-2''/C-6'') ; 126,8 (C-8'') ; 116,2 (C-3''/C-5'') ; 114,8 (C-3/C-5) ; 106,7 (C-3') ; 105,3 (C-1') ; 95,0 (C-5') ; 55,6 (4-OMe) ; 47,3 (C-8) ; 31,6 (C-7) ; 26,4 (C-9''). Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles de la littérature ⁹.

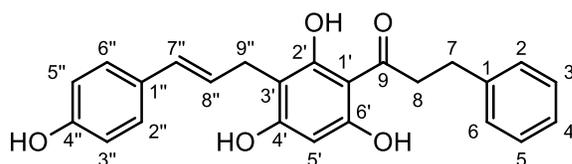


Figure 32 : Structure de la balsacone C **27**

Balsacone C **27** : L'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (28,7 mg ; 191 μmol) et la DHCc **10** (198 mg ; 765 μmol) ont été placés dans un ballon sous atmosphère d'argon. Les réactifs ont été mis en solution avec de l'acétate d'éthyle et de l'APTS supporté (~ 2 mmol/g ; 191 mg ; 382 μmol) y a été ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant la nuit à TA et le suivi de la réaction a été fait par CCM en phase inverse (MeOH/H₂O 85:15). Une fois la réaction terminée, l'APTS supporté a été filtré sur un entonnoir en verre fritté et rincé avec plusieurs portions d'acétate d'éthyle. Le filtrat a été évaporé pour obtenir un résidu sec. Le résidu a ensuite été purifié sur colonne en phase normale (DCM/EtOAc 95:5 à 70:30). Le produit final a été suspendu dans l'eau et lyophilisé. La balsacone C **27** est obtenue sous une forme de poudre rosée (28,0 mg ; R = 38 % ; **Figure 32**). RMN ^1H (500 MHz, (CD₃)₂CO) : δ 13,96 (s, 1H, 2'-OH) ; 9,56 (br s, 1H, Ar-OH) ; 9,15 (br s, 1H, Ar-OH) ; 8,21 (br s, 1H, Ar-OH) ; 7,32 – 7,22 (m, 4H, H-2/H-6 ; H-3/H-5) ; 7,21 – 7,13 (m, 3H, H-2''/H-6'' ; H-4) ; 6,74 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-3''/H-5'') ; 6,34 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-7'') ; 6,16 (dt, $J = 15,8$; 6,6 Hz, 1H, H-8'') ; 6,10 (s, 1H, H-5') ; 3,43 – 3,39 (m, 4H, H-8 ; H-9'') ; 3,01 – 2,97 (m, 2H, H-7). RMN ^{13}C (126 MHz, (CD₃)₂CO) : δ 205,4 (C-9) ; 166,2 (C-2') ; 162,9 (C-4') ; 160,8 (C-6') ; 157,3 (C-4'') ; 143,0 (C-1) ; 130,6 (C-1'') ; 130,1 (C-7'') ; 129,3 (C-2/C-6) ; 129,2 (C-3/C-5) ; 127,9 (C-2''/C-6'') ; 126,6 (C-4) ; 126,3 (C-8'') ; 116,1 (C-3''/C-5'') ; 106,6 (C-3') ; 105,1 (C-1') ; 95,1 (C-5') ; 46,5 (C-8) ; 31,5 (C-7) ; 26,2 (C-9''). Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont en accord avec celles de la littérature ⁹.

4.7 Hémisynthèses *in situ*

Méthode générale : L'alcool 4-hydroxycinnamique **80** et la fraction **A2** sont placés dans un ballon sous atmosphère d'argon. Les réactifs sont mis en solution avec de l'acétate d'éthyle et de l'APTS supporté (~ 2 mmol/g, 2n alcool) y est ajouté. Le mélange réactionnel est agité pendant la nuit à TA et le suivi de la réaction est fait par CCM en

phase inverse (MeOH/H₂O 85:15). Une fois la réaction terminée, l'APTS supporté est filtré sur un entonnoir en verre fritté et rincé avec plusieurs portions d'acétate d'éthyle. Le filtrat est évaporé pour obtenir un résidu sec. Le produit final est suspendu dans l'eau et lyophilisé.

Hémisynthèse *in situ* (**P1**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (2,49 mg ; 16,6 µmol ; 5 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (49,8 mg) en présence d'APTS supporté (16,6 mg ; 33,2 µmol), le produit **P1** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (51,7 mg).

Hémisynthèse *in situ* (**P2**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (12,0 mg ; 79,9 µmol ; 10 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (120 mg) en présence d'APTS supporté (79,9 mg ; 159 µmol), le produit **P2** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (132 mg).

Hémisynthèse *in situ* (**P3**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (18,1 mg ; 120 µmol ; 15 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (120 mg) en présence d'APTS supporté (120 mg ; 241 µmol), le produit **P3** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (120 mg).

Hémisynthèse *in situ* (**P4**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (24,1 mg ; 160 µmol ; 20 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (120 mg) en présence d'APTS supporté (160 mg ; 321 µmol), le produit **P4** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (119 mg).

Hémisynthèse *in situ* (**P5**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (15,2 mg ; 101 µmol ; 30 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (50,7 mg) en présence d'APTS supporté (101 mg ; 203 µmol), le produit **P5** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (62,1 mg).

Hémisynthèse *in situ* (**P6**) : Selon la **méthode générale**, à partir de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (17,6 mg ; 117 µmol ; 35 %m de la fraction **A2**) et de la fraction **A2** (50,2 mg) en présence d'APTS supporté (117 mg ; 234 µmol), le produit **P6** a été obtenu sur forme d'une poudre jaune-orange (63,4 mg).

4.8 Tests biologiques

Les tests antibiotiques ont été réalisés en utilisant une version modifiée de la méthode de microdilution de Banfi *et al.*¹⁰⁹. L'activité antibactérienne des extraits et des composés purs est évaluée sur *E. coli*, *S. aureus* et le SARM. Les souches de SARM utilisées dans ces tests antibiotiques ont été identifiées par Côté *et al.*⁶⁷. Les bactéries sont ensemencées dans des plaques à 96 puits (Costar, Corning Inc.) à des densités de 5×10^3 bactéries par puits pour *E. coli* (ATCC 25922) ou de $3,5 \times 10^4$ bactéries par puits pour *S. aureus* (ATCC 25923) et les dix souches de SARM (don du Centre intégré universitaire de santé et

services sociaux (CIUSSS) du Saguenay-Lac-Saint-Jean) dans 100 μL d'un bouillon nutritif (Difco). Un volume de 100 μL de concentrations croissantes d'extraits ou de composés, dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et dilué dans du bouillon nutritif, est ensuite ajouté dans chaque puits. La concentration finale en DMSO dans le milieu de culture est de 0,1 %v pour éviter la toxicité du solvant. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C. Une lecture d'absorbance à 600 nm est prise, à la suite de laquelle 50 μL de résazurine (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 30 min, la fluorescence des puits est mesurée (530/590 nm) à l'aide d'un lecteur de plaque Fluoroskan (ThermoFisher Scientific). Chaque expérience a été réalisée deux fois et la balsacone C 27 a été utilisé comme contrôle.

Les résultats des tests antibactériens ont été soumis à des analyses de variance (ANOVA) réalisées grâce au logiciel JMP Pro 16 (SAS Institute). Les résultats des analyses sont exprimés avec un intervalle de confiance de 95 % ($\alpha = 0,05$). Pour les résultats contre le SARM, les données (CMI_{90}) ont été transformées telles que $y' = \sqrt{y}$ et les différents facteurs sont : le pourcentage d'alcool utilisé ($\%_{\text{alcool}}$), le numéro d'expérience (#exp.), le numéro de SARM (#SARM), ainsi que le croisement des deux premiers facteurs ($\%_{\text{alcool}} * \# \text{exp.}$). Le facteur #SARM est considéré comme un facteur aléatoire et le facteur $\%_{\text{alcool}}$ est considéré comme ayant des données continues pour la modélisation ou comme ayant des données nominales pour les analyses par paires (HSD de Tukey). Pour la modélisation, les valeurs prévues l'ANOVA sont retransformées selon $y = y'^2$. Lors des analyses par paires, les données de la fraction C ont été ajoutées afin de la comparer aux extraits enrichis en balsacones (P1 à P6). Les données contre *S. aureus* ont été analysées de la même façon, sans le facteur #SARM.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés selon la méthode d'O'Brien *et al.*¹¹⁰. Les cellules WS-1 sont placées dans des plaques à 96 puits (Costar, Corning Inc.) à une densité de 5×10^3 cellules par puits dans 100 μL du milieu de culture (DMEM avec une solution à 10 % de sérum fœtal bovin, de la pénicilline et de la streptomycine) et sont incubées pendant 16 h. Un volume de 100 μL de concentrations croissantes d'extraits ou de composés, dissout dans de l'éthanol (Sigma-Aldrich) et dilué dans le milieu de culture (DMEM), est ensuite ajouté dans chaque puits. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 h à 37 °C. La concentration finale en éthanol dans le milieu de culture est de 0,5 %v pour éviter la toxicité du solvant. L'activité cytotoxique est évaluée grâce à l'analyse de la fluorescence de la résazurine par un lecteur de plaque automatique Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) suite à l'excitation de cette dernière à 530 nm puis son émission à 590 nm. Le pourcentage de survie est déterminé grâce à la fluorescence de chaque puits expérimental, en la comparant aux valeurs des puits de contrôle après avoir soustrait les valeurs du blanc. Chaque expérience a été réalisée deux fois.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Gould, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (3), 572-575. DOI: 10.1093/jac/dkv484.
- (2) Aminov, R. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, Review. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- (3) Uddin, T. M.; Chakraborty, A. J.; Khusro, A.; Zidan, B. M. R. M.; Mitra, S.; Emran, T. B.; Dhama, K.; Ripon, M. K. H.; Gajdács, M.; Sahibzada, M. U. K.; et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J. Infect. Public Health.* **2021**, *14* (12), 1750-1766. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.10.020.
- (4) Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* **2021**, *10* (10), 1310.
- (5) OMS, O. m. d. l. S. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022*; World Health Organization, Geneva, 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/364996>.
- (6) Dodds, D. R. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 139-146. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.12.005.
- (7) Marie-Victorin, F. E. C.; Brouillet, L.; Rouleau, E.; Goulet, I.; Hay, S. *Flore laurentienne*; G. Morin, 2002.
- (8) Moerman, D. E. *Native American medicinal plants : an ethnobotanical dictionary*; Timber Press, 2009.
- (9) Lavoie, S.; Legault, J.; Simard, F.; Chiasson, É.; Pichette, A. New antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (13), 1631-1633. DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.12.012.
- (10) Simard, F.; Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Mshvildadze, V.; Pichette, A. Structure elucidation of anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) flavonoids from balsam poplar buds. *Biorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (18), 4188-4198. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.009.
- (11) Simard, F.; Gauthier, C.; Chiasson, É.; Lavoie, S.; Mshvildadze, V.; Legault, J.; Pichette, A. Antibacterial Balsacones J–M, Hydroxycinnamoylated Dihydrochalcones from *Populus balsamifera* Buds. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (5), 1147-1153. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00155.
- (12) Simard, F.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. Balsacones D-I, dihydrocinnamoyl flavans from *Populus balsamifera* buds. *Phytochemistry* **2014**, *100*, 141-149. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.12.018.
- (13) Burmaoğlu, S. Total Syntheses of Balsacone B and Balsacone C. *J. Turk. Chem. Soc., Sect. A* **2017**, *4*, 709-720.
- (14) Polat, M. F. Synthesis of Asebogenin and Balsacone A Precursor by a Novel Synthetic Strategy: Recent Opportunities for and Challenges of Total Synthesis of Balsacone A. *Molecules* **2022**, *27* (11). DOI: 10.3390/molecules27113523.
- (15) Ollis, W. D. The neoflavanoids, a new class of natural products. *Experientia* **1966**, *22* (12), 777-783. DOI: 10.1007/bf01897407.
- (16) Conserva, L. M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R.; Martinez V, J. C.; Gottlieb, H. E. Iryantherins, lignoflavonoids of novel structural types from the *Myristicaceae*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (12), 3911-3918. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85358-M.
- (17) Alsarraf, J.; Bilodeau, J.-F.; Legault, J.; Simard, F.; Pichette, A. Exploring the Biomass-Derived Chemical Space Emerging from Natural Dihydrochalcones through the Single-Step Hemisynthesis of Antibacterial Balsacones. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8* (16), 6194-6199. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c01545.
- (18) Bilodeau, J.-F. Hémisynthèse des balsacones A, B, C et d'analogues à partir de précurseurs biosourcés. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2020.
- (19) Murray, C. J. L.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399* (10325), 629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- (20) Palumbi, S. R. Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science* **2001**, *293* (5536), 1786-1790. DOI: doi:10.1126/science.293.5536.1786.
- (21) Palumbi, S. *The evolution explosion : how humans cause rapid evolutionary change* / Stephen R. Palumbi; New York : Norton, 2001.
- (22) Singer, R.; Finch, R.; Wegener, H.; Bywater, R.; Walters, J.; Lipsitch, M. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3* (1), 47-51. DOI: 10.1016/S1473-3099(03)00490-0.
- (23) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2010**, *74* (3), 417-433. DOI: doi:10.1128/MMBR.00016-10.

- (24) Laxminarayan, R.; Sridhar, D.; Blaser, M.; Wang, M.; Woolhouse, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science* **2016**, *353* (6302), 874-875. DOI: 10.1126/science.aaf9286.
- (25) Aminov, R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11* (12), 2970-2988. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
- (26) Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (1), 1-14. DOI: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004.
- (27) Pitout, J. D.; Laupland, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8* (3), 159-166. DOI: 10.1016/s1473-3099(08)70041-0.
- (28) Shaikh, S.; Fatima, J.; Shakil, S.; Rizvi, S. M.; Kamal, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22* (1), 90-101. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- (29) Yuan, J.; Chow, D. C.; Huang, W.; Palzkill, T. Identification of a β -lactamase inhibitory protein variant that is a potent inhibitor of *Staphylococcus* PC1 β -lactamase. *J. Mol. Biol.* **2011**, *406* (5), 730-744. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.01.014.
- (30) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3472-3500. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- (31) Holmberg, S. D.; Solomon, S. L.; Blake, P. A. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev. Infect. Dis.* **1987**, *9* (6), 1065-1078. DOI: 10.1093/clinids/9.6.1065.
- (32) CCA. *When Antibiotics Fail. The Expert Panel on the Potential Socio-Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in Canada*; Council of Canadian Academies, 2019. https://cca-reports.ca/wp-content/uploads/2023/05/Updated-AMR-report_EN.pdf (accessed 13/06/2024).
- (33) Bush, L. *Infections à Staphylococcus aureus*. Merck Manuals, 2021. <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/accueil/infections/infections-bactériennes-bactéries-gram-positives/infections-à-staphylococcus-aureus> (accessed 08/05/2022).
- (34) Kwiecinski, J. M.; Horswill, A. R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **2020**, *53*, 51-60. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.005.
- (35) Dryden, M. S. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *34 Suppl 1*, S2-7. DOI: 10.1016/s0924-8579(09)70541-2.
- (36) Wertheim, H. F.; Melles, D. C.; Vos, M. C.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H. A.; Nouwen, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5* (12), 751-762. DOI: 10.1016/s1473-3099(05)70295-4.
- (37) Michael Marcy, S.; Klein, J. O. The Isoxazolyl Penicillins: Oxacillin, Cloxacillin, and Dicloxacillin. *Med. Clin. North Am.* **1970**, *54* (5), 1127-1143. DOI: 10.1016/S0025-7125(16)32582-2.
- (38) Stapleton, P. D.; Taylor, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.* **2002**, *85* (Pt 1), 57-72. DOI: 10.3184/003685002783238870.
- (39) Bonomo, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7* (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a025239.
- (40) Lee, A. S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4* (1), 18033. DOI: 10.1038/nrdp.2018.33.
- (41) Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 119-146. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- (42) Chang, S.; Sievert, D. M.; Hageman, J. C.; Boulton, M. L.; Tenover, F. C.; Downes, F. P.; Shah, S.; Rudrik, J. T.; Pupp, G. R.; Brown, W. J.; et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348* (14), 1342-1347. DOI: 10.1056/NEJMoa025025.
- (43) Sievert, D.; Boulton, M.; Stoltman, G.; Johnson, D.; Stobierski, M.; Downes, F.; Somsel, P.; Rudrik, J.; Brown, W.; Hafeez, W.; et al. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2002**, *51* (26), 565-567.
- (44) Lee, C. H.; Wang, M. C.; Huang, I. W.; Chen, F. J.; Lauderdale, T. L. Development of daptomycin nonsusceptibility with heterogeneous vancomycin-intermediate resistance and oxacillin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during high-dose daptomycin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (9), 4038-4040. DOI: 10.1128/aac.00533-10.

- (45) Mamma, C.; Bonura, C.; di Carlo, P.; Calà, C.; Aleo, A.; Monastero, R.; Palma, D. M. Daptomycin non-susceptible, vancomycin intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from a chronic leg ulcer, Italy. *Scand. J. Infect. Dis.* **2010**, *42* (11-12), 955-957. DOI: 10.3109/00365548.2010.524662.
- (46) Biedenbach, D. J.; Alm, R. A.; Lahiri, S. D.; Reiszner, E.; Hoban, D. J.; Sahm, D. F.; Bouchillon, S. K.; Ambler, J. E. In Vitro Activity of Ceftaroline against *Staphylococcus aureus* Isolated in 2012 from Asia-Pacific Countries as Part of the AWARE Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (1), 343-347. DOI: 10.1128/aac.01867-15.
- (47) Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M. *Natural products : phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, pehnolics and terpenes*; Springer, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6.
- (48) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
- (49) Bruneton, J.; Poupon, E. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*; Tec & Doc, 2016.
- (50) Williams, A. H. Phenolic Substances of Pear – Apple Hybrids. *Nature* **1955**, *175* (4448), 213-213. DOI: 10.1038/175213a0.
- (51) Lu, Y.; Yeap Foo, L. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chem.* **1998**, *61* (1), 29-33. DOI: 10.1016/S0308-8146(97)00123-4.
- (52) Williams, A. H. Dihydrochalcones; their Occurrence and Use as Indicators in Chemical Plant Taxonomy. *Nature* **1964**, *202* (4934), 824-825. DOI: 10.1038/202824b0.
- (53) Ling, T.; Lin, L. D.; Wu, P.; Zhou, W. H.; Ye, H. G.; Liu, M. F.; Wei, X. Y. Dihydrochalcones from *Symplocos vacciniifolia*. *Chin. Chem. Lett.* **2004**, *15*, 1182-1184.
- (54) Mabry, T. J.; Sakakibara, M.; King, B. Asebotin and its aglucone from three species of *Rhododendron*. *Phytochemistry* **1975**, *14* (5), 1448-1450. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)98660-6.
- (55) Conserva, L. M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. Diarylpropanes from *Iryanthera ulei*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (12), 3986-3988. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85388-V.
- (56) Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chem.* **1996**, *55* (4), 403-411. DOI: 10.1016/0308-8146(95)00166-2.
- (57) Ichimaru, M.; Nakatani, N.; Takahashi, T.; Nishiyama, Y.; Moriyasu, M.; Kato, A.; Mathenge, S. G.; Juma, F. D.; Nganga, J. N. Cytotoxic C-benzylated dihydrochalcones from *Uvaria acuminata*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52* (1), 138-141. DOI: 10.1248/cpb.52.138.
- (58) Wang, Y.; Xu, K.; Lin, L.; Pan, Y.; Zheng, X. Geranyl flavonoids from the leaves of *Artocarpus altilis*. *Phytochemistry* **2007**, *68* (9), 1300-1306. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.01.009.
- (59) Nishiura, M.; Esaki, S.; Kamiya, S. Flavonoids in *Citrus* and Related Genera. *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33* (8), 1109-1118. DOI: 10.1080/00021369.1969.10859437.
- (60) Krishnamurthy, H. G.; Sathyanarayana, S. Catalytic Transfer Hydrogenation, A Facile Conversion of Hydroxyflavanones Into Hydroxydihydrochalcones. *Synth. Commun.* **1989**, *19* (1-2), 119-123. DOI: 10.1080/00397918908050959.
- (61) Robertson, G. H.; Clark, J. P.; Lundin, R. Dihydrochalcone Sweeteners: Preparation of Neohesperidin Dihydrochalcone. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1974**, *13* (2), 125-129. DOI: 10.1021/i360050a009.
- (62) Gascon, M. 13 - Masking agents for use in foods. In *Modifying Flavour in Food*, Taylor, A., Hort, J. Eds.; Woodhead Publishing, 2007; pp 232-242.
- (63) Yang, Q.; Tong, Y.; Chen, F.; Qi, Y.; Li, W.; Wu, S. Identification and Synthesis of Impurities in Pinocembrin—A New Drug for the Treatment of Ischemic Stroke. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30* (6), 1315-1319. DOI: 10.1002/cjoc.201200201.
- (64) Rivière, C. Chapter 7 - Dihydrochalcones: Occurrence in the Plant Kingdom, Chemistry and Biological Activities. In *Stud. Nat. Prod. Chem.*, Atta ur, R. Ed.; Vol. 51; Elsevier, 2016; pp 253-381.
- (65) Marles, R. J. *Aboriginal plant use in Canada's northwest boreal forest*; UBC Press, 2000.
- (66) Foster, S.; Tyler, V. E. *Tyler's honest herbal : a sensible guide to the use of herbs and related remedies*; Haworth, 1999.
- (67) Côté, H.; Pichette, A.; Simard, F.; Ouellette, M. E.; Ripoll, L.; Mihoub, M.; Grimard, D.; Legault, J. Balsacone C, a New Antibiotic Targeting Bacterial Cell Membranes, Inhibits Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Without Inducing Resistance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2341. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02341.
- (68) Bélanger, A.; Grenier, A.; Simard, F.; Gendreau, I.; Pichette, A.; Legault, J.; Pouliot, R. Dihydrochalcone Derivatives from *Populus balsamifera* L. Buds for the Treatment of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (1), 256.

- (69) Sum, T. H.; Sum, T. J.; Stokes, J. E.; Galloway, W. R. J. D.; Spring, D. R. Divergent and concise total syntheses of dihydrochalcones and 5-deoxyflavones recently isolated from *Tacca* species and *Mimosa diplotricha*. *Tetrahedron* **2015**, *71* (26), 4557-4564. DOI: 10.1016/j.tet.2015.02.017.
- (70) Wang, Z.; Yang, L.; Yang, X.; Zhang, X. Advances in the First Total Synthesis of Natural Flavonoids. *Synth. Commun.* **2013**, *43* (23), 3093-3114. DOI: 10.1080/00397911.2013.820835.
- (71) Nguyen, V.-S.; Dong, L.-P.; Wang, S.-C.; Wang, Q. The First Total Synthesis of Sophoflavescenol, Flavenochromane C, and Citrusinol. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (10), 2297-2302. DOI: 10.1002/ejoc.201403689.
- (72) Jesus, A. R.; Vila-Viçosa, D.; Machuqueiro, M.; Marques, A. P.; Dore, T. M.; Rauter, A. P. Targeting Type 2 Diabetes with C-Glucosyl Dihydrochalcones as Selective Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (2), 568-579. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01134.
- (73) Siddaiah, V.; Rao, C. V.; Venkateswarlu, S.; Subbaraju, G. V. A concise synthesis of polyhydroxydihydrochalcones and homoisoflavonoids. *Tetrahedron* **2006**, *62* (5), 841-846. DOI: 10.1016/j.tet.2005.10.059.
- (74) Clark, J. H. Green chemistry: challenges and opportunities. *Green Chem.* **1999**, *1* (1), 1-8. DOI: 10.1039/A807961G.
- (75) Ollis, W. D.; Gottlieb, O. R. Biogenetic relations involving the neoflavanoids and their congeners. *Chem. Commun. (London)* **1968**, (22), 1396-1397. DOI: 10.1039/C19680001396.
- (76) Jurd, L. Cinnamyl alcohol: Polyphenol condensations in aqueous solutions. *Tetrahedron* **1969**, *25* (7), 1407-1416. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)82710-1.
- (77) Mageswaran, S.; Ollis, W. D.; Roberts, R. J.; Sutherland, I. O. Biogenetic models for the formation of natural cinnamylphenols and neoflavanoids. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10* (34), 2897-2900. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)88302-7.
- (78) Gregson, M.; Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Roberts, R. J.; Sutherland, I. O.; de Oliveira, A. B.; Eyton, W. B.; Gottlieb, O. R.; Dietrichs, H. H. The natural occurrence of cis- and trans-cinnamylphenols. *Chem. Commun. (London)* **1968**, (22), 1390-1392. DOI: 10.1039/C19680001390.
- (79) Jurd, L.; King, A. D.; Mihara, K.; Stanley, W. L. Antimicrobial Properties of Natural Phenols and Related Compounds. *Appl. Microbiol.* **1971**, *21* (3), 507-510. DOI: 10.1128/am.21.3.507-510.1971.
- (80) Jurd, L. Biogenetic-type syntheses of obtusastirene and 4-methoxydalbergione. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10* (33), 2863-2866. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)88293-9.
- (81) Jurd, L.; Stevens, K.; Manners, G. Acid-catalyzed and thermal rearrangements of obtusaquinol and related 3,3-diarylpropenes. *Tetrahedron* **1973**, *29* (16), 2347-2353. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)93361-7.
- (82) Friedel, C.; Crafts, J. Organic chemistry. *J. Chem. Soc.* **1877**, *32* (0), 725-791. DOI: 10.1039/JS8773200725.
- (83) Rueping, M.; Nachtsheim, B. J. A review of new developments in the Friedel–Crafts alkylation – From green chemistry to asymmetric catalysis. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 6. DOI: 10.3762/bjoc.6.6.
- (84) Tsuchimoto, T.; Tobita, K.; Hiyama, T.; Fukuzawa, S.-i. Scandium(III) Triflate Catalyzed Friedel-Crafts Alkylation with Benzyl and Allyl Alcohols. *Synlett* **1996**, *1996* (06), 557-559. DOI: 10.1055/s-1996-5498.
- (85) Sanz, R.; Martínez, A.; Miguel, D.; Álvarez-Gutiérrez, J. M.; Rodríguez, F. Brønsted Acid-Catalyzed Nucleophilic Substitution of Alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (14), 1841-1845. DOI: 10.1002/adsc.200606183.
- (86) Le Bras, J.; Muzart, J. Brønsted-acid-catalyzed coupling of electron-rich arenes with substituted allylic and secondary benzylic alcohols. *Tetrahedron* **2007**, *63* (33), 7942-7948. DOI: 10.1016/j.tet.2007.05.070.
- (87) Bandini, M.; Tragni, M. π -Activated alcohols: an emerging class of alkylating agents for catalytic Friedel–Crafts reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (8), 1501-1507. DOI: 10.1039/B823217B.
- (88) Hall, D. G. Boronic acid catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (13), 3475-3496. DOI: 10.1039/C9CS00191C.
- (89) Jain, A. C.; Gupta, R. K. Cinnamylation studies of 5,7-dihydroxy-2-methylisoflavone and chromone. *Tetrahedron* **1975**, *31* (6), 511-516. DOI: 10.1016/0040-4020(75)85021-6.
- (90) Grenier, A.; Legault, J.; Pichette, A.; Jean, L.; Bélanger, A.; Pouliot, R. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Aging Potential of a *Kalmia angustifolia* Extract and Identification of Some Major Compounds. *Antioxidants* **2021**, *10* (9). DOI: 10.3390/antiox10091373.
- (91) Yao, G.-M.; Ding, Y.; Zuo, J.-P.; Wang, H.-B.; Wang, Y.-B.; Ding, B.-Y.; Chiu, P.; Qin, G.-W. Dihydrochalcones from the Leaves of *Pieris japonica*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (3), 392-396. DOI: 10.1021/np049698a.

- (92) Mapunya, M. B.; Hussein, A. A.; Rodriguez, B.; Lall, N. Tyrosinase activity of *Greyia flanaganii* (Bolus) constituents. *Phytomedicine* **2011**, *18* (11), 1006-1012. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.03.013.
- (93) Orjala, J.; Wright, A. D.; Behrends, H.; Folkers, G.; Sticher, O.; Rügger, H.; Rali, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (1), 18-26. DOI: 10.1021/np50103a003.
- (94) Quílez, A.; Berenguer, B.; Gilardoni, G.; Souccar, C.; de Mendonça, S.; Oliveira, L. F. S.; Martín-Calero, M. J.; Vidari, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128* (3), 583-589. DOI: 10.1016/j.jep.2010.01.060.
- (95) Cabanillas, B. J.; Le Lamer, A. C.; Castillo, D.; Arevalo, J.; Estevez, Y.; Rojas, R.; Valadeau, C.; Bourdy, G.; Sauvain, M.; Fabre, N. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. *Planta Med.* **2012**, *78* (9), 914-918. DOI: 10.1055/s-0031-1298459.
- (96) Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, Z. A.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (18), 3975-3980. DOI: 10.1016/s0968-0896(03)00406-1.
- (97) Joshi, A. S.; Li, X. C.; Nimrod, A. C.; ElSohly, H. N.; Walker, L. A.; Clark, A. M. Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. *Planta Med.* **2001**, *67* (02), 186-188. DOI: 10.1055/s-2001-11517.
- (98) Jeerapong, C.; Cheenpracha, S.; Maneerat, W.; Prawat, U.; Kruahong, T.; Laphookhieo, S. The First Hydroperoxydihydrochalcone in the *Etingera* Genus: Etinglittoralin from the Rhizomes of *Etingera littoralis*. *Heterocycles* **2011**, *42* (33). DOI: 10.1002/chin.201133207.
- (99) Liliana Garzon, N.; Luis, E.; Cuca, S.; Juan, C.; Martinez, V.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. Flavonolignoid from the fruit of *Iryanthera laevis*. *Phytochemistry* **1987**, *26* (10), 2835-2837. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)83600-6.
- (100) Silva, D. H. S.; Yoshida, M.; Kato, M. J. Flavonoids from *Iryanthera sagotiana*. *Phytochemistry* **1997**, *46* (3), 579-582. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00306-3.
- (101) Tanaka, H.; Ichino, K.; Ito, K. Dihydrochalcones from *Lindera umbellata*. *Phytochemistry* **1984**, *23* (5), 1198-1199. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)82646-1.
- (102) Ichino, K.; Tanaka, H.; Ito, K. Two novel flavonoids from the leaves of *Lindera umbellata* var. *Lancea* and *L. Umbellata*. *Tetrahedron* **1988**, *44* (11), 3251-3260. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)85958-5.
- (103) Cheenpracha, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Subhadhirasakul, S.; Tewtrakul, S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Biorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (6), 1710-1714. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.10.019.
- (104) Bohlmann, F.; Abraham, W.-R. Neue, chloresubstituierte thiophenacetylenverbindungen mit ungewöhnlicher struktur aus *Helichrysum*-arten. *Phytochemistry* **1979**, *18* (5), 839-842. DOI: 10.1016/0031-9422(79)80024-2.
- (105) Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, C. R.; Abou-Shehada, S.; Dunn, P. J. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem.* **2016**, *18* (1), 288-296. DOI: 10.1039/C5GC01008J.
- (106) Tukey, J. W. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* **1949**, *5* (2), 99-114. DOI: 10.2307/3001913.
- (107) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176-2179. DOI: 10.1021/om100106e.
- (108) Quideau, S.; Ralph, J. Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and *p*-coumaryl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40* (7), 1108-1110. DOI: 10.1021/jf00019a003.
- (109) Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin, C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52* (5), 796-800. DOI: 10.1093/jac/dkg439.
- (110) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421-5426. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

ANNEXES

SPECTRES RMN

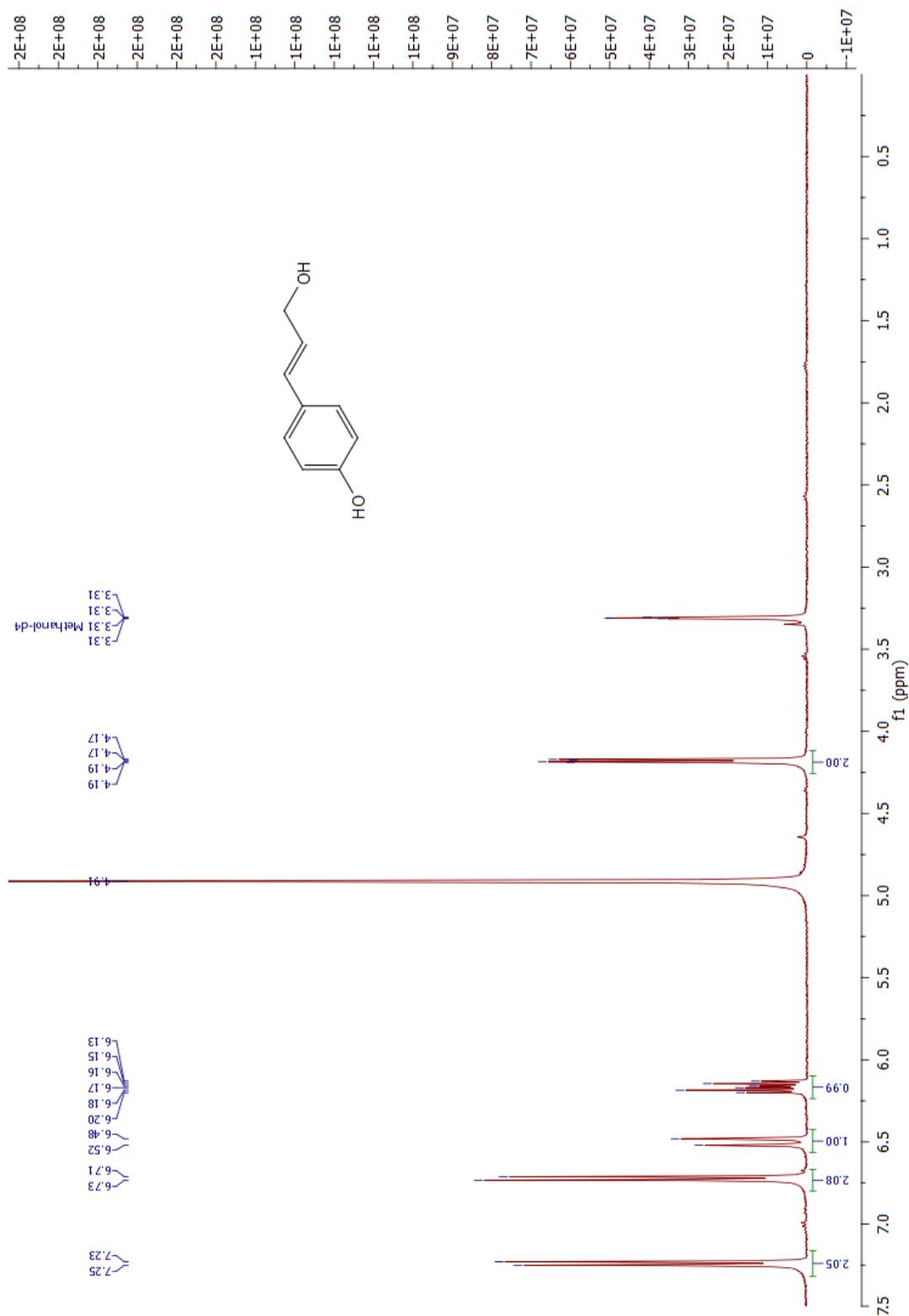


Figure 33 : Spectre RMN ^1H de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (400 MHz, MeOD)

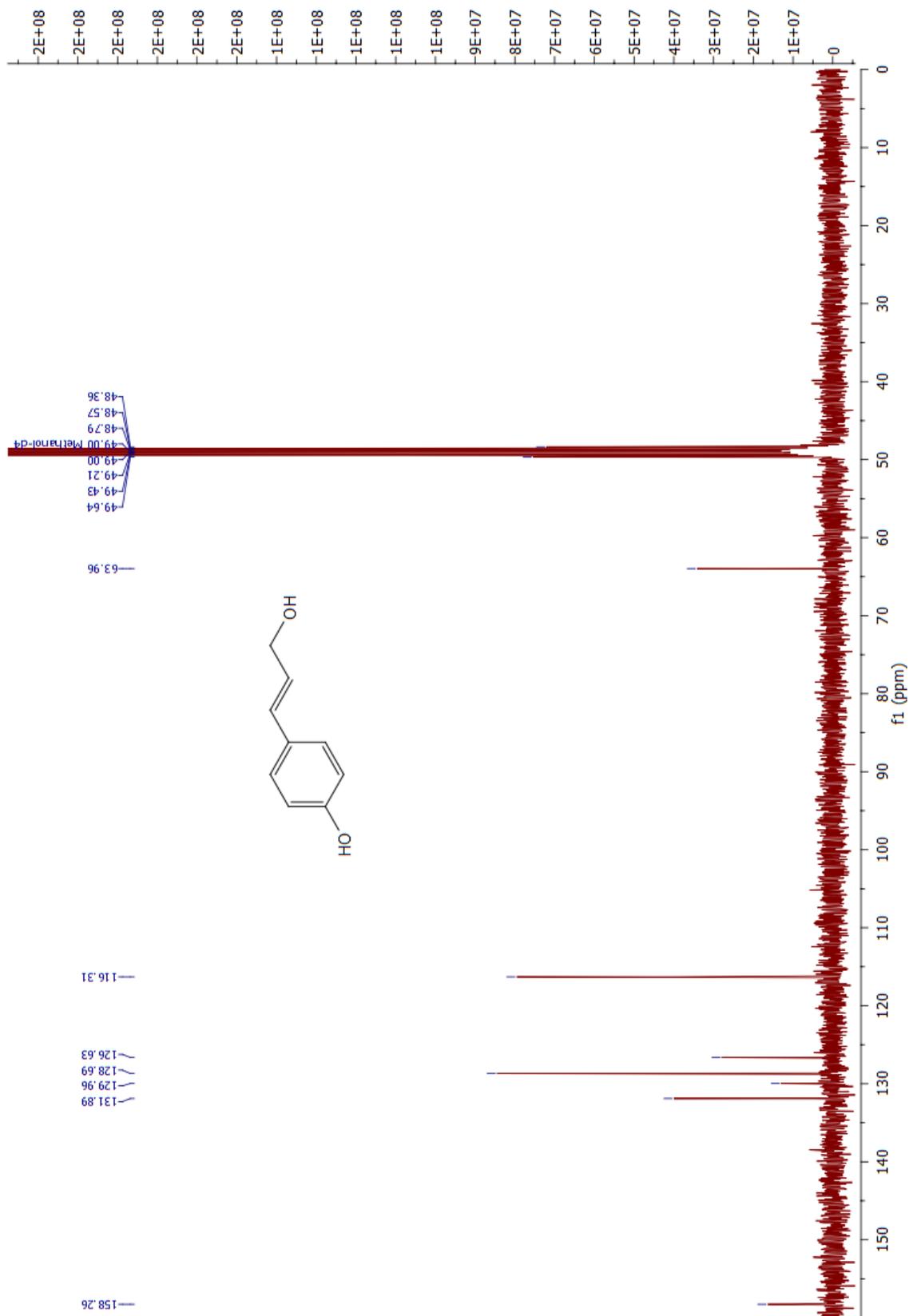


Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C de l'alcool 4-hydroxycinnamique **80** (100 MHz, MeOD)

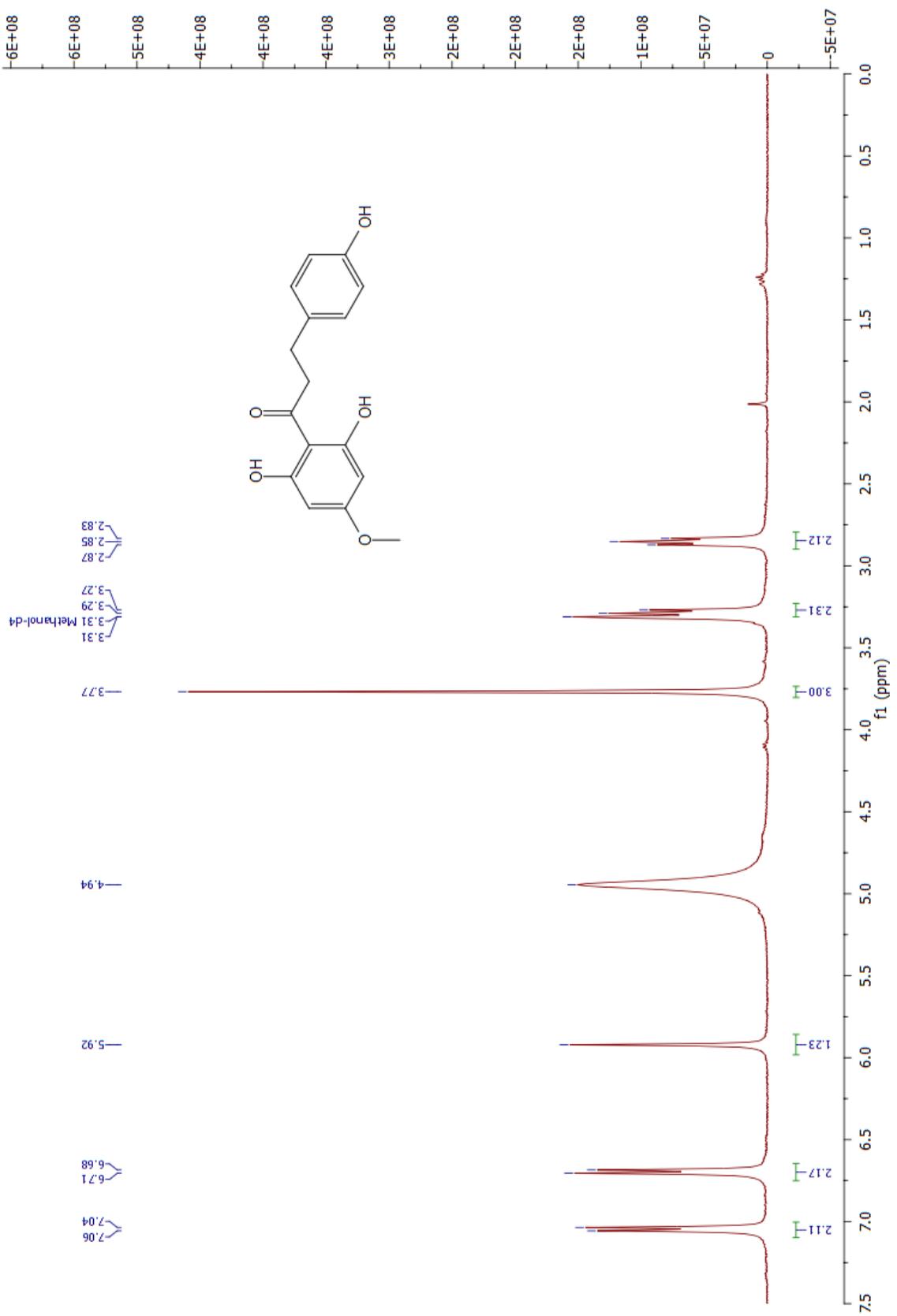


Figure 35 : Spectre RMN ^1H du 4,2',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone **8** (400 MHz, MeOD)

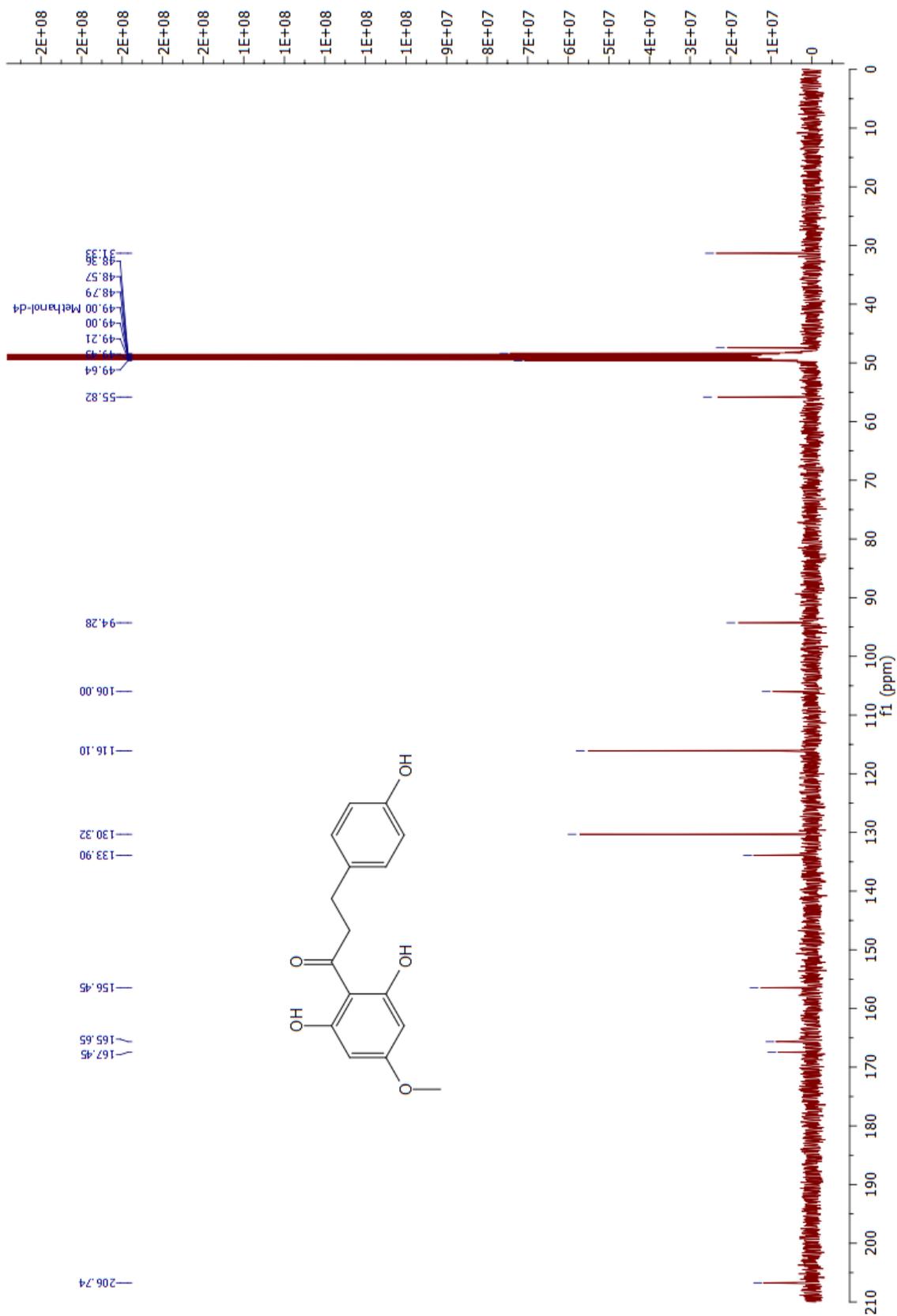


Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C du 4,2',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone **8** (100 MHz, MeOD)

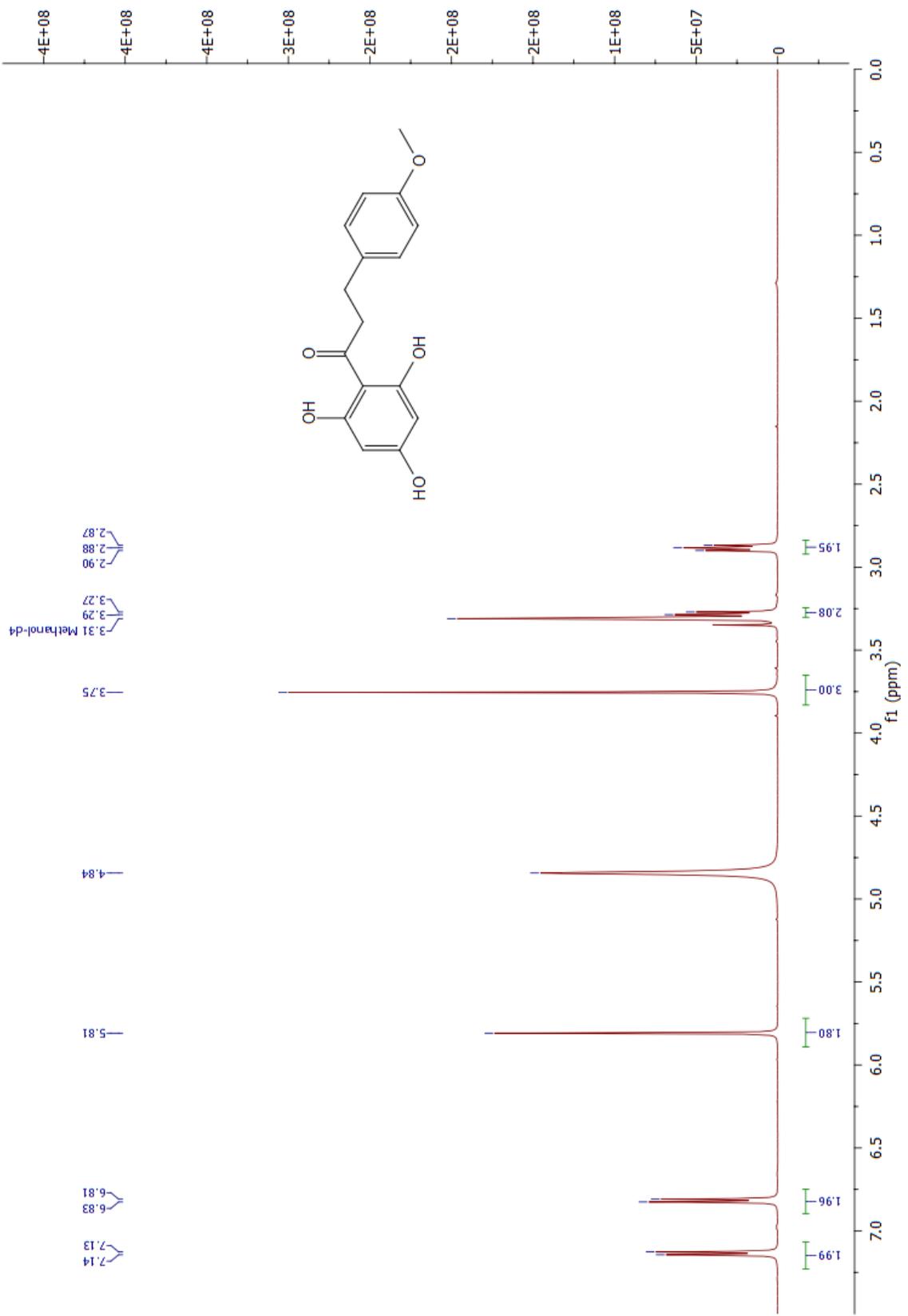


Figure 37 : Spectre RMN ^1H du 2',4',6'-trihydroxy-4-methoxydihydrochalcone **9** (500 MHz, MeOD)

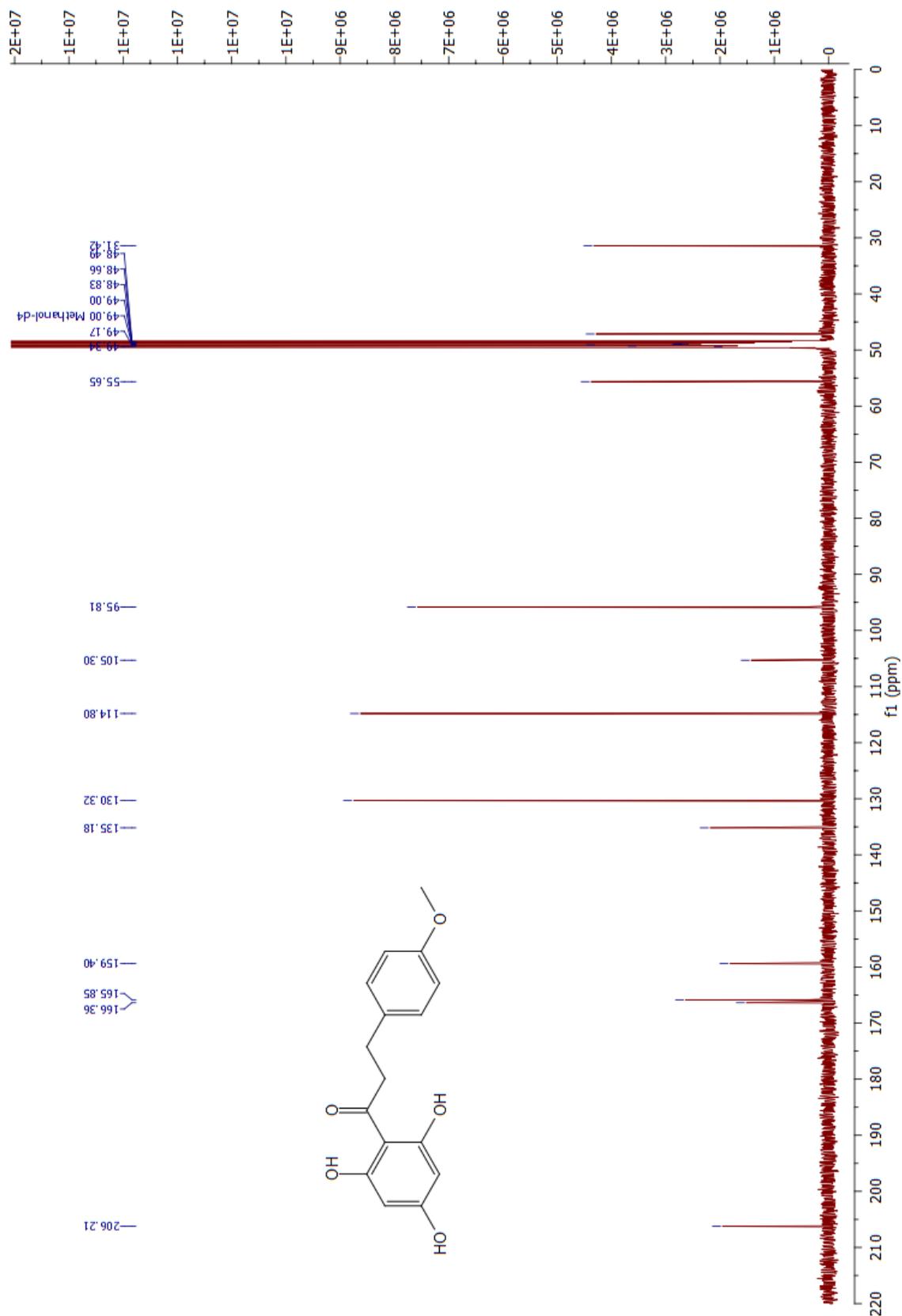


Figure 38 : Spectre RMN ^{13}C du 2',4',6'-trihydroxy-4-methoxydihydrochalcone **9** (126 MHz, MeOD)

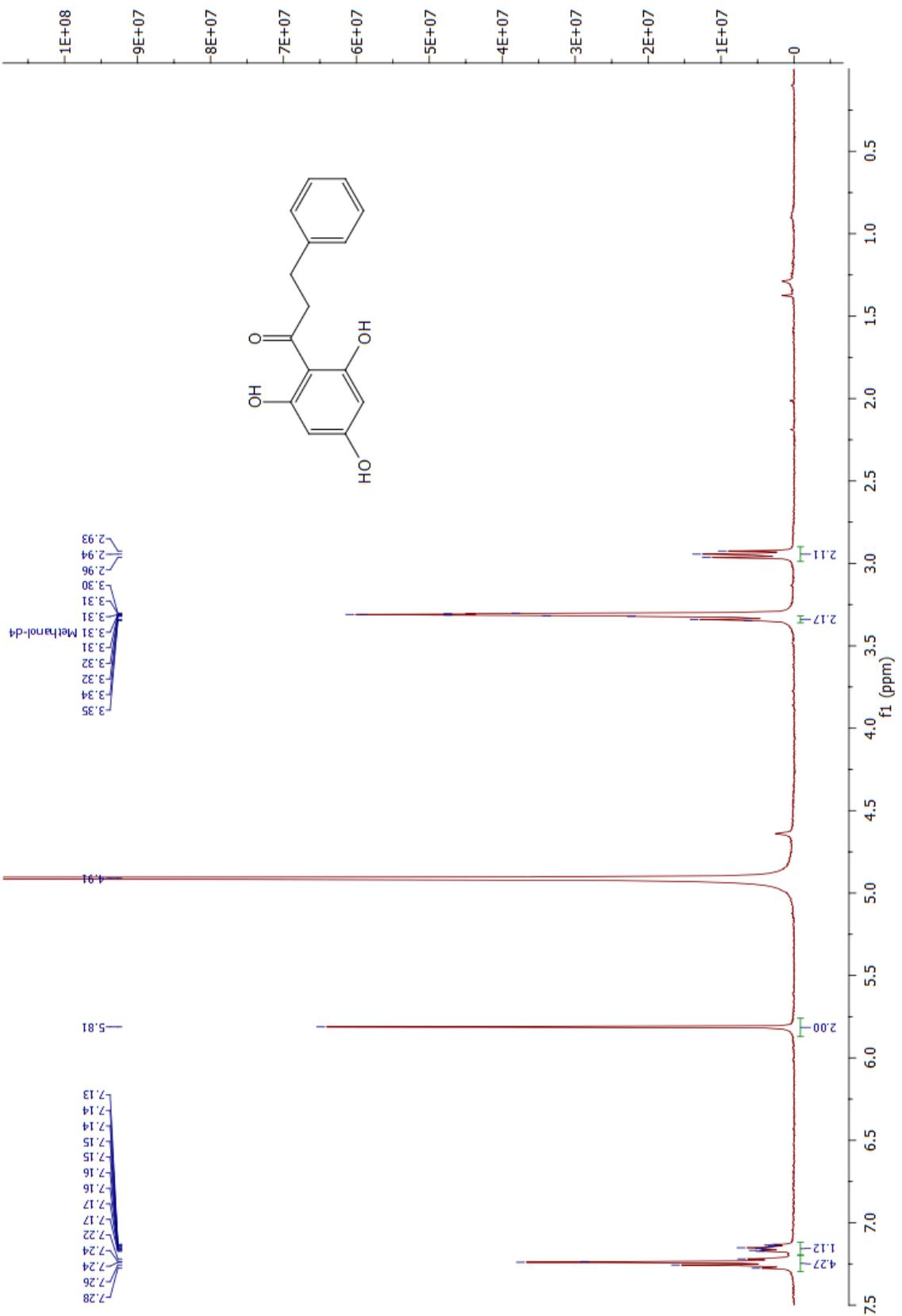


Figure 39 : Spectre RMN ¹H du 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone **10** (400 MHz, MeOD)

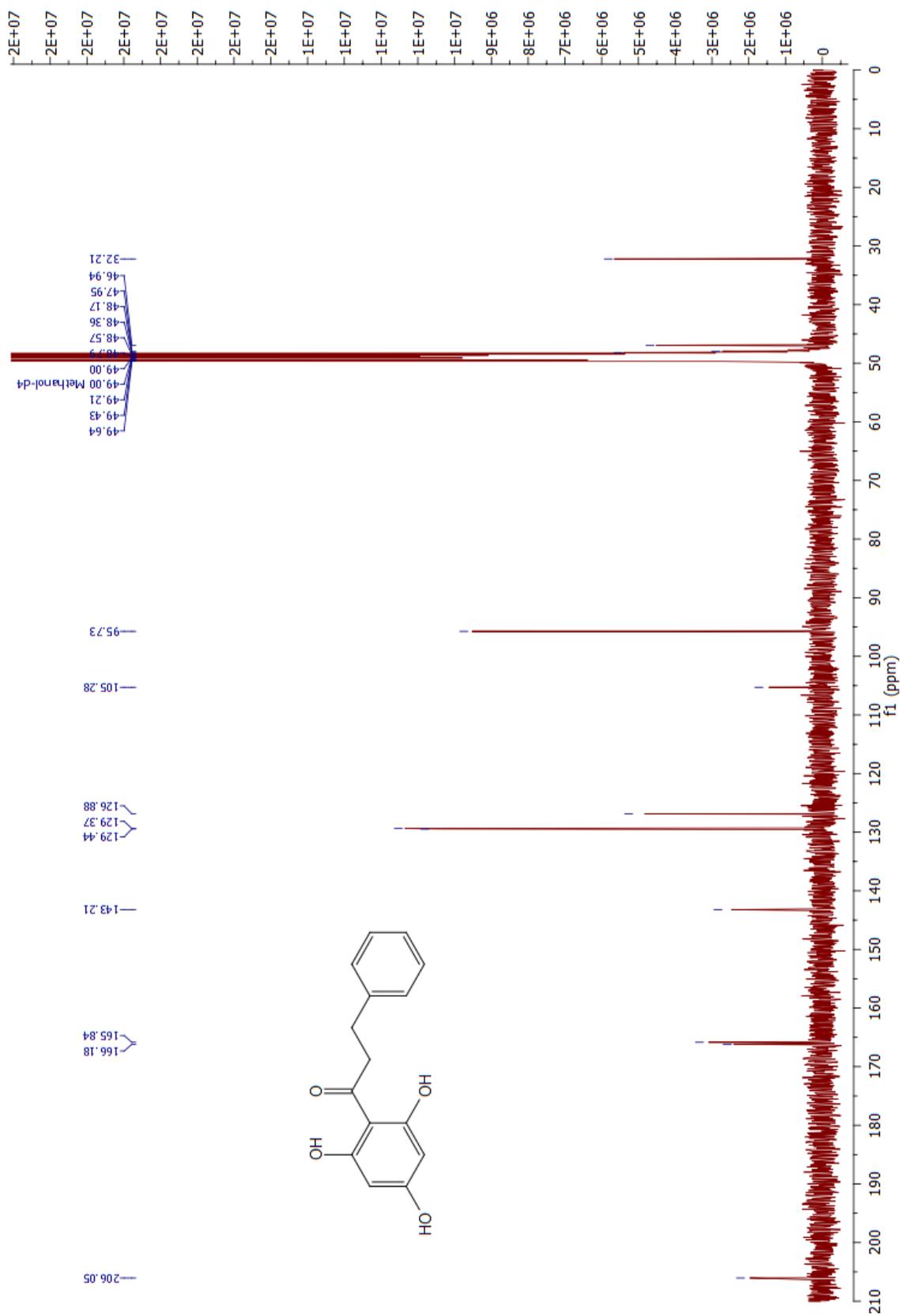


Figure 40 : Spectre RMN ^{13}C du 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone **10**
(100 MHz, MeOD)

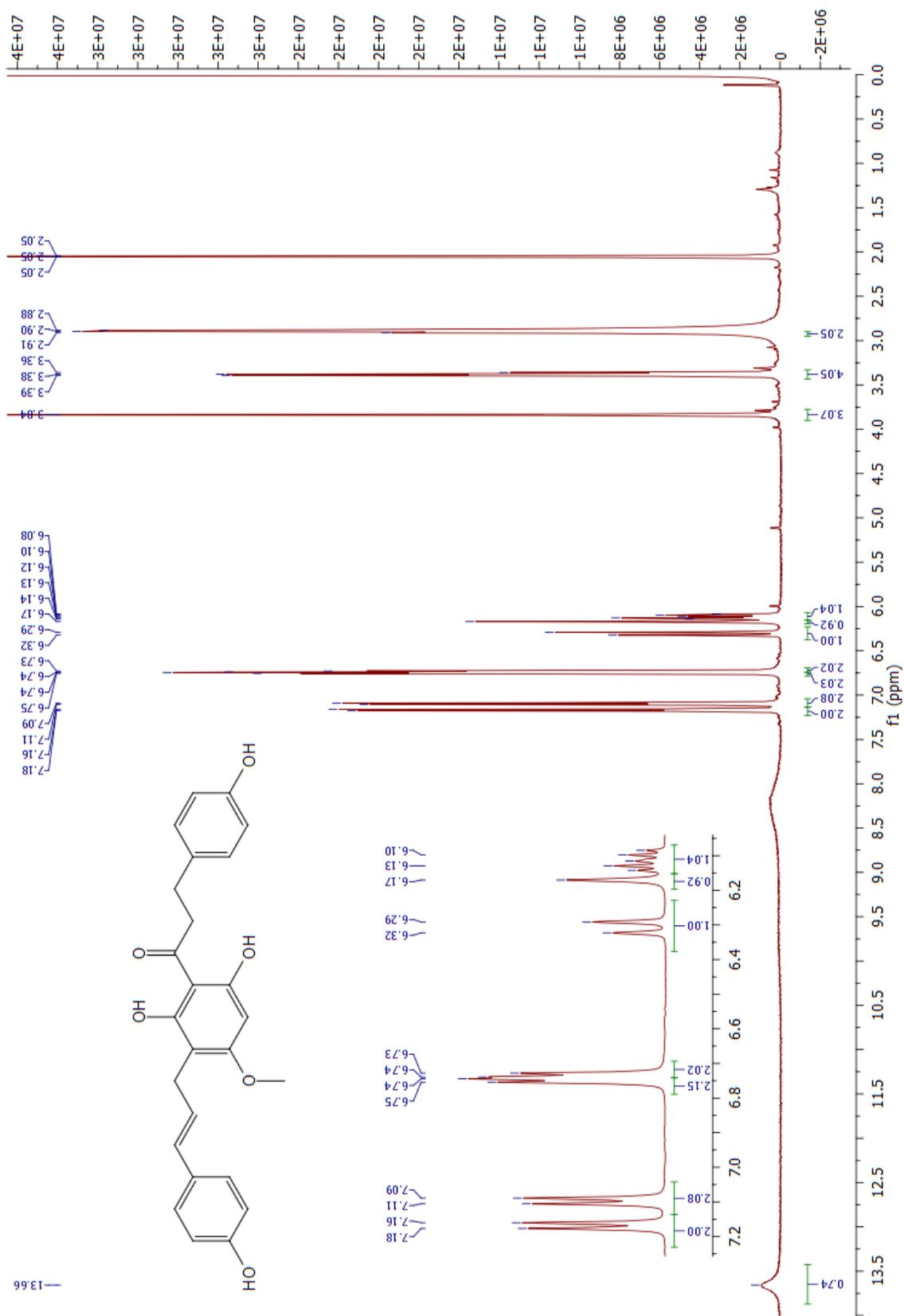


Figure 41 : Spectre RMN ^1H de la balsacone A **25** (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

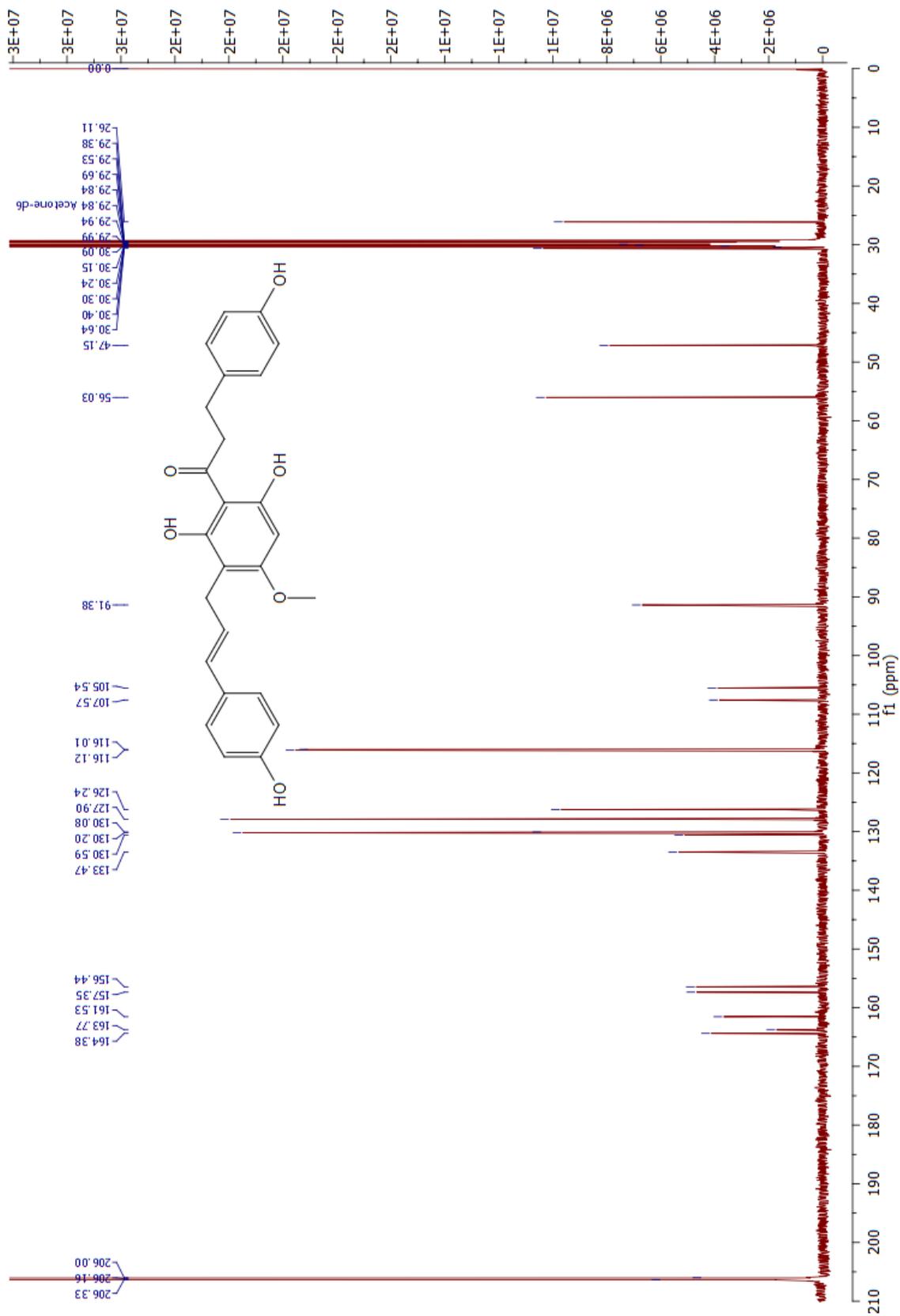


Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C de la balsacone A **25** (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

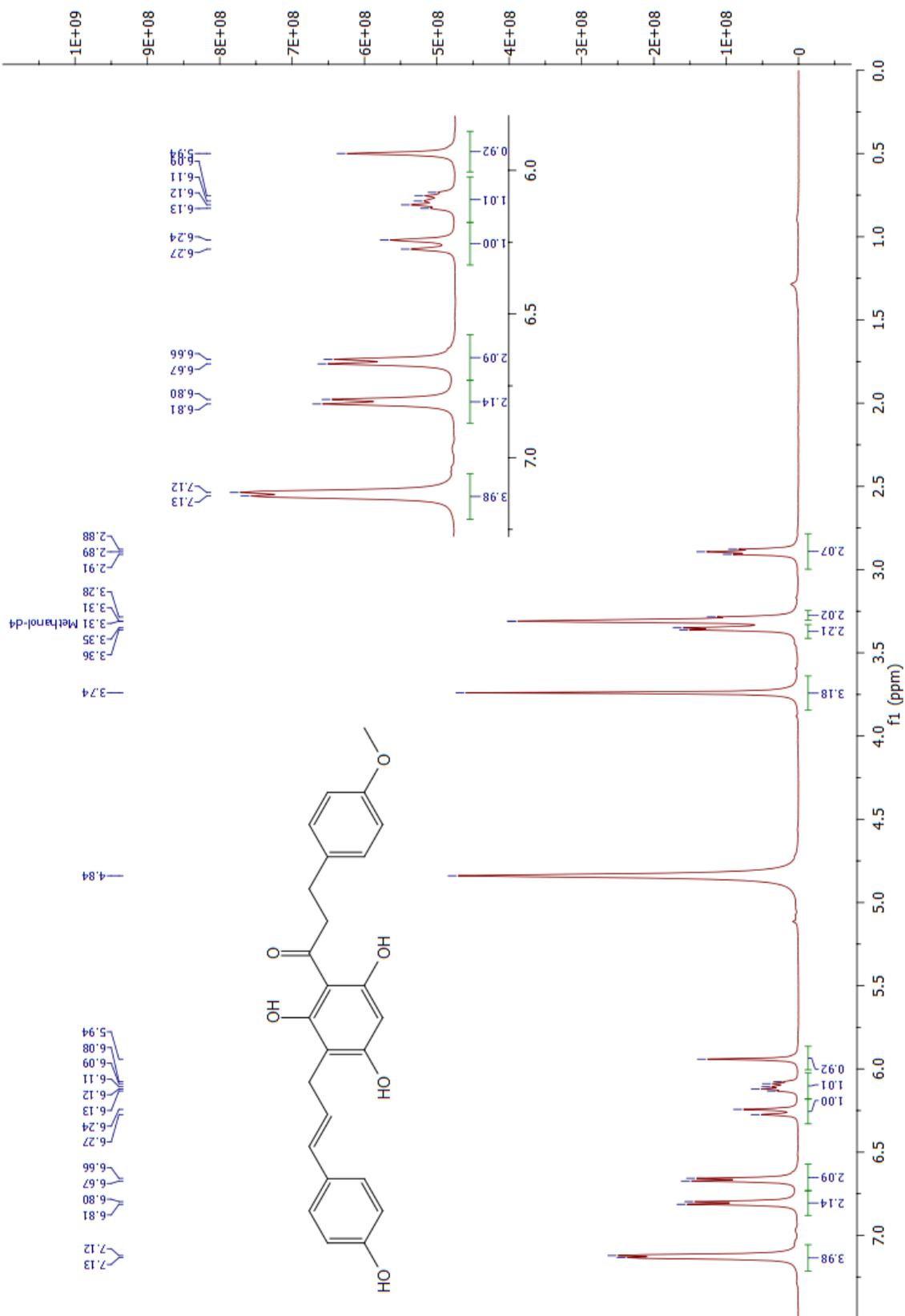


Figure 43 : Spectre RMN ^1H de la balsacone B **26** (500 MHz, MeOH)

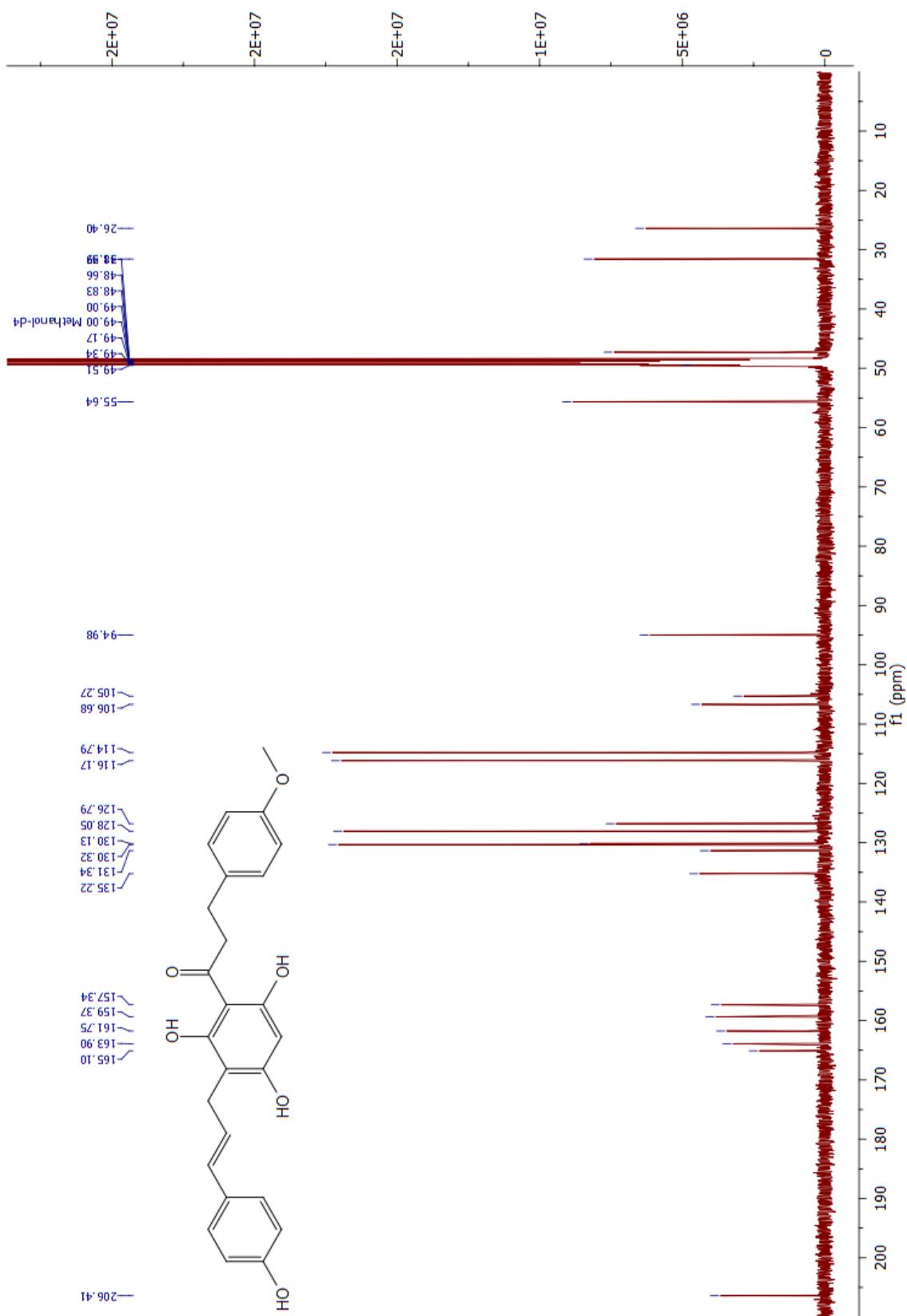
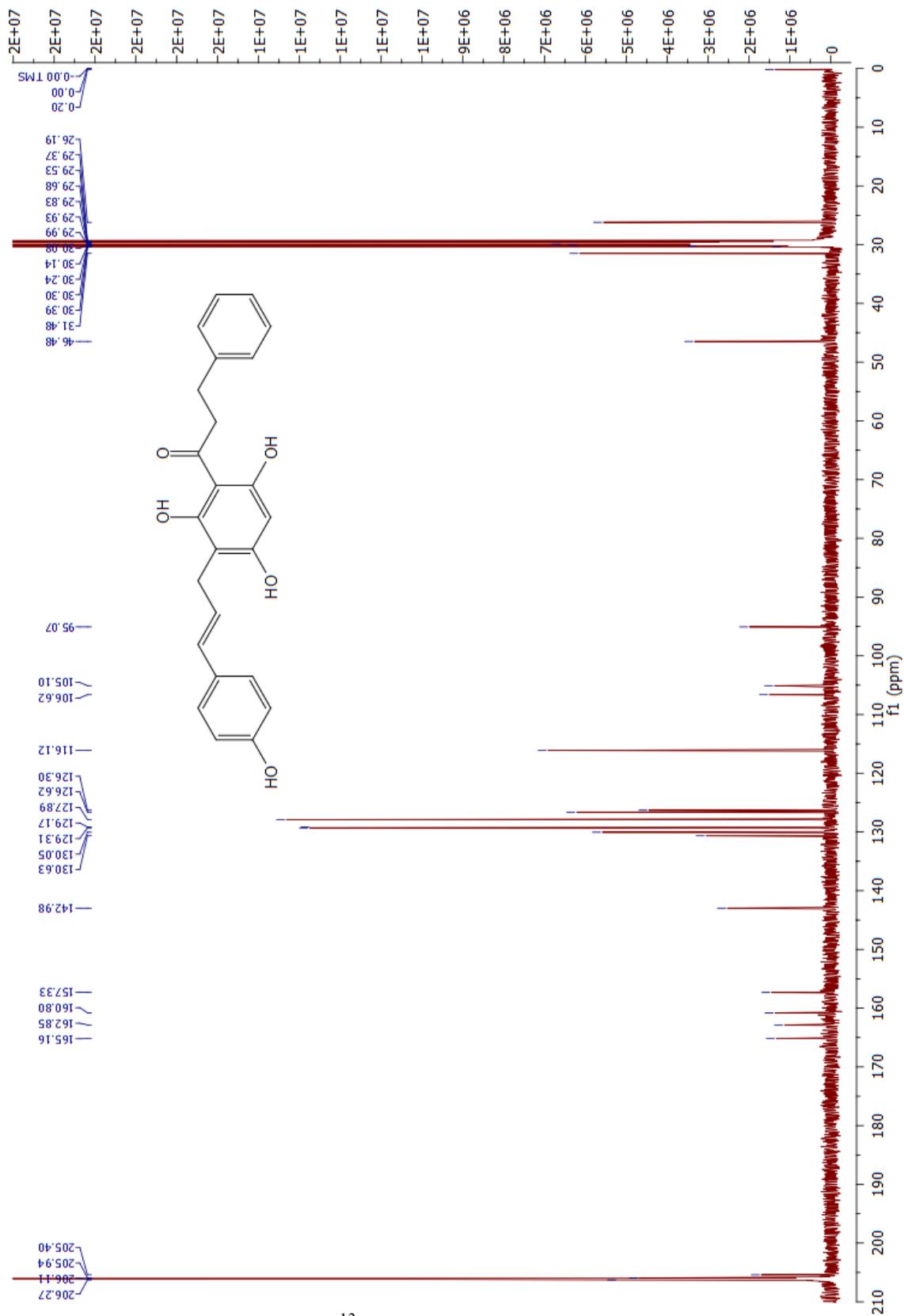


Figure 44 : Spectre RMN ¹³C de la balsacone B **26** (126 MHz, MeOH)



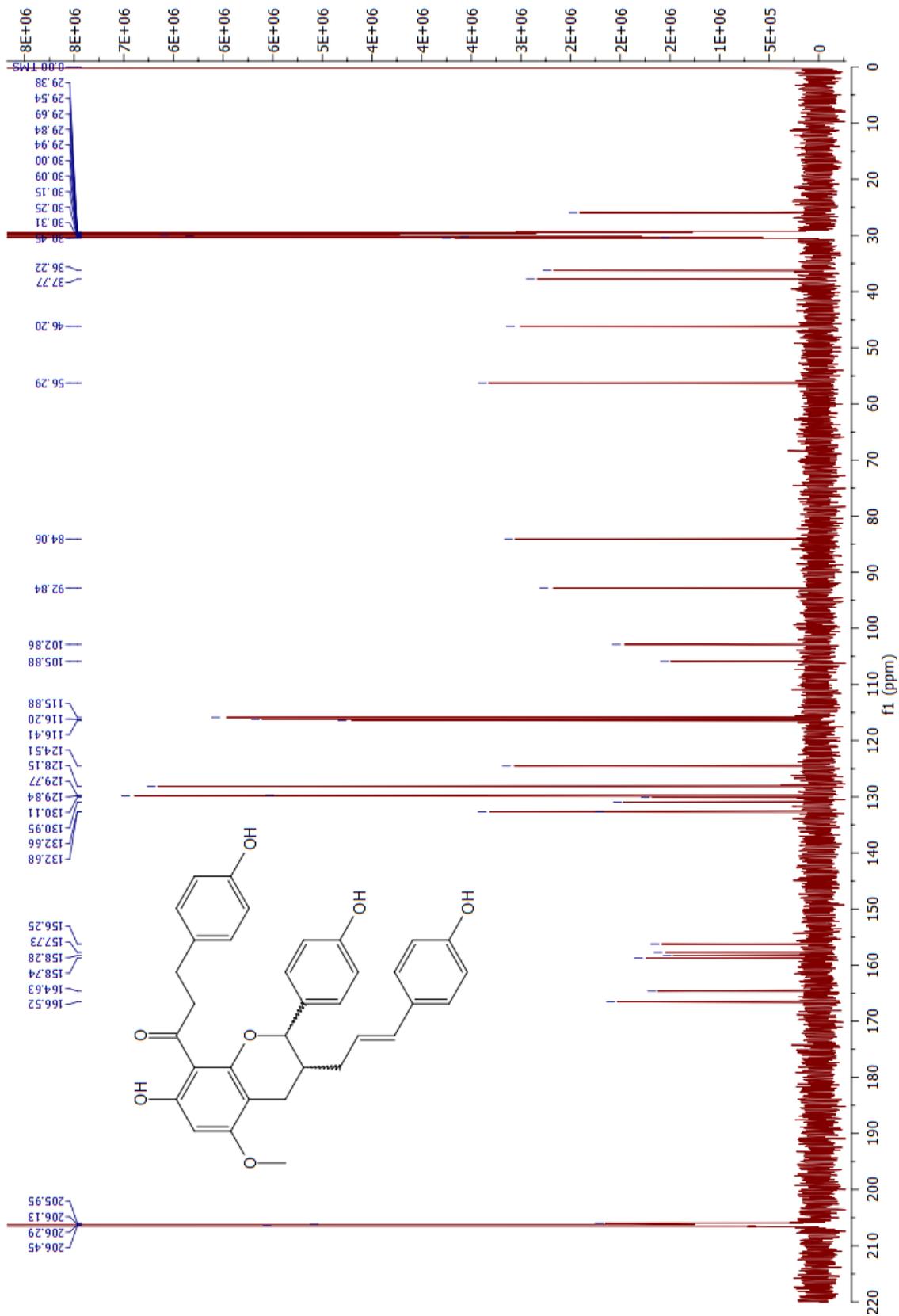


Figure 48 : Spectre RMN ^{13}C de la balsacone K **28** (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

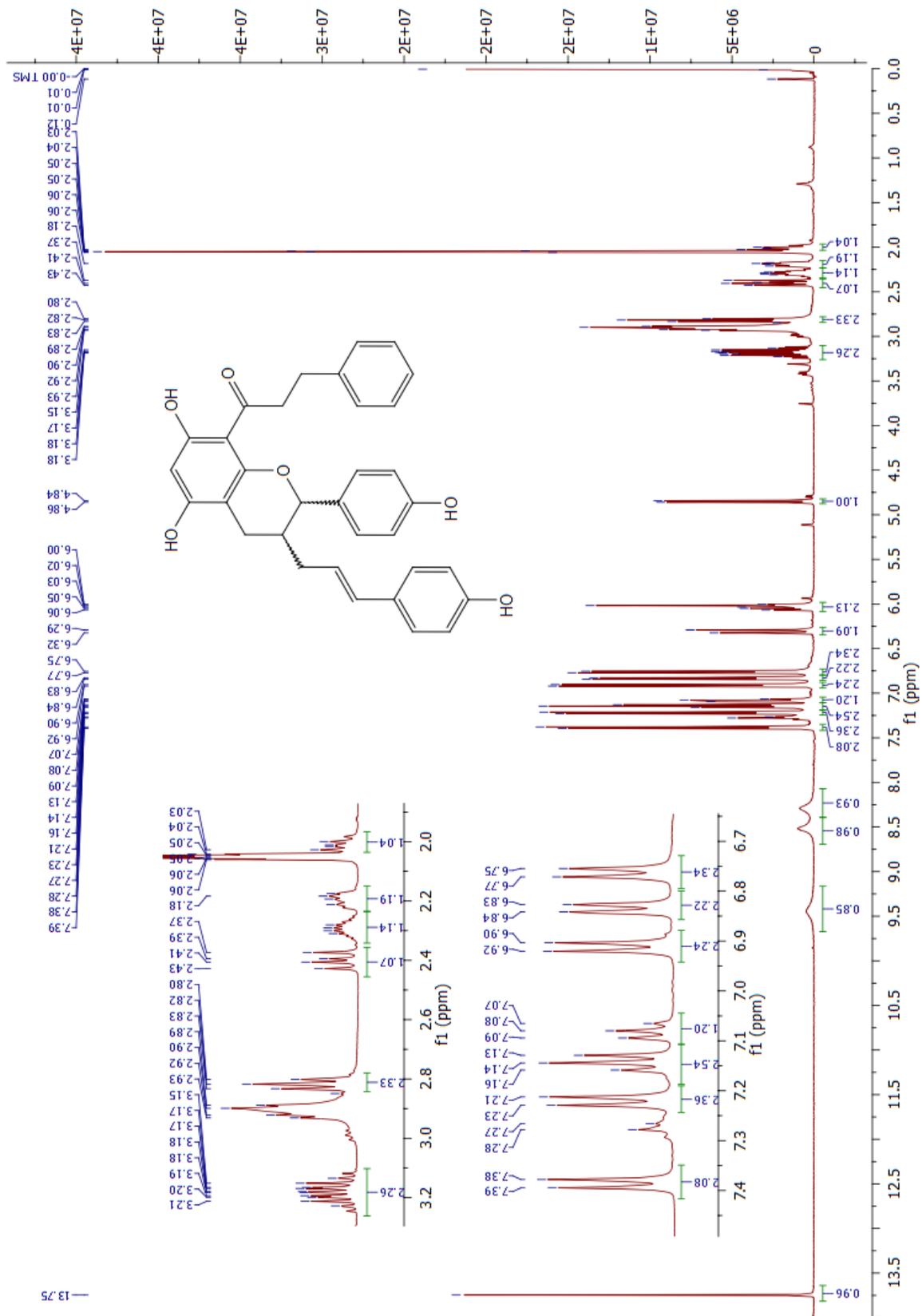


Figure 49 : Spectre RMN ^1H de la balsacone J **30** (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

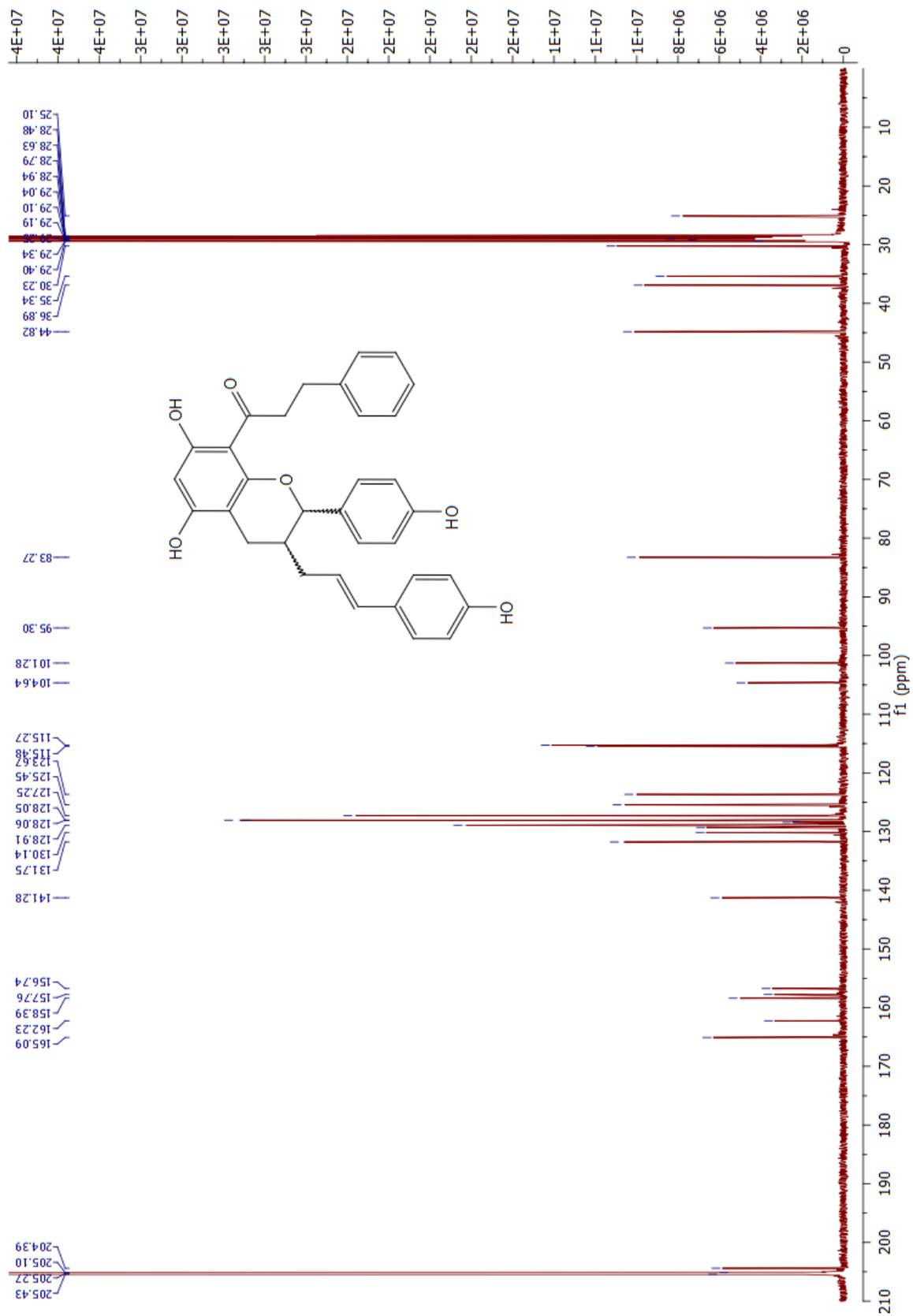


Figure 50 : Spectre RMN ^{13}C de la balsacone J **30** (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

COURBES D'ETALONNAGE (CLHP)

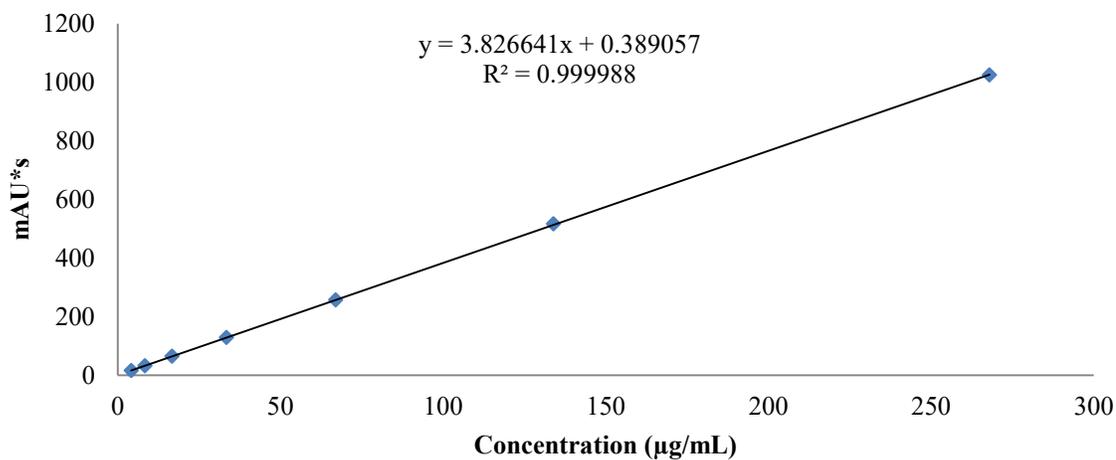


Figure 51 : Courbe d'étalonnage de la DHCa **8** à 284 nm

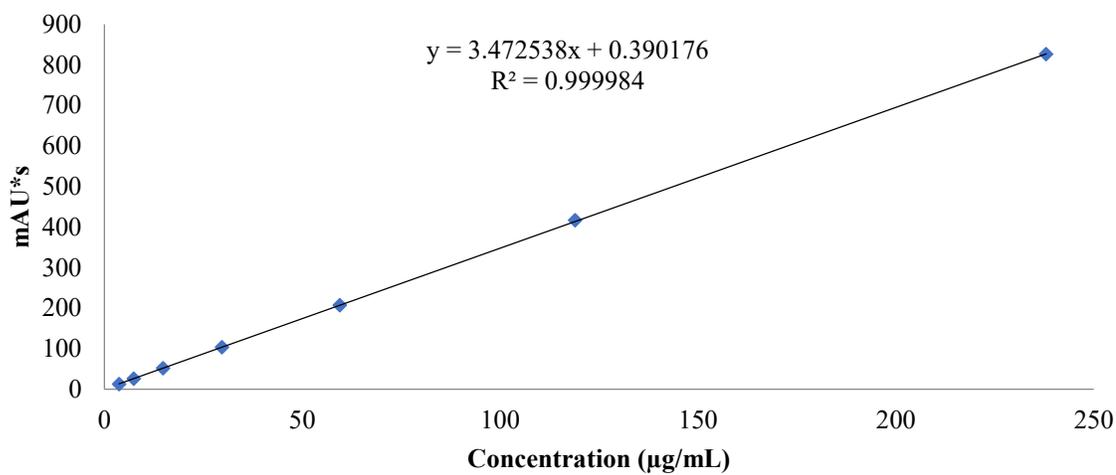


Figure 52 : Courbe d'étalonnage de la DHCb **9** à 284 nm

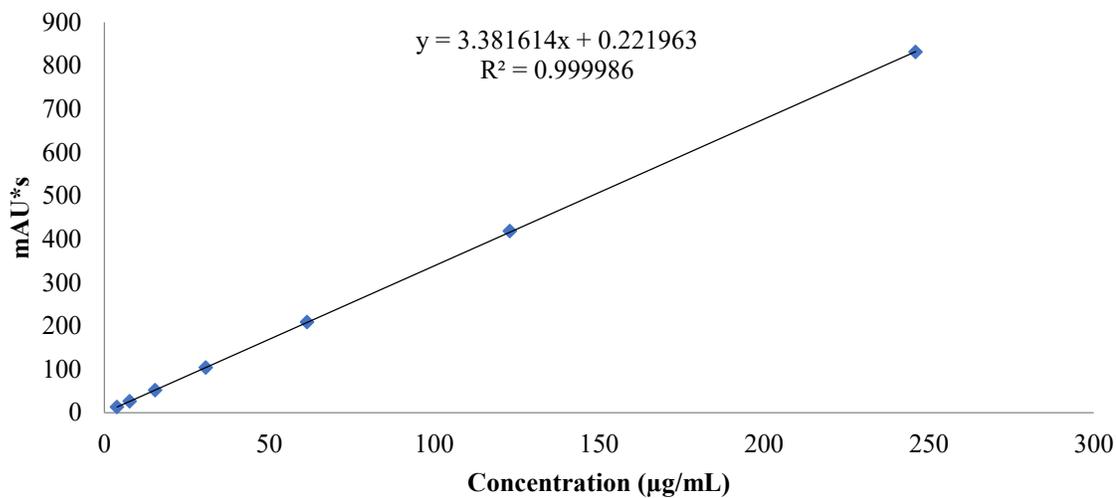


Figure 53 : Courbe d'étalonnage de la DHCc 10 à 284 nm

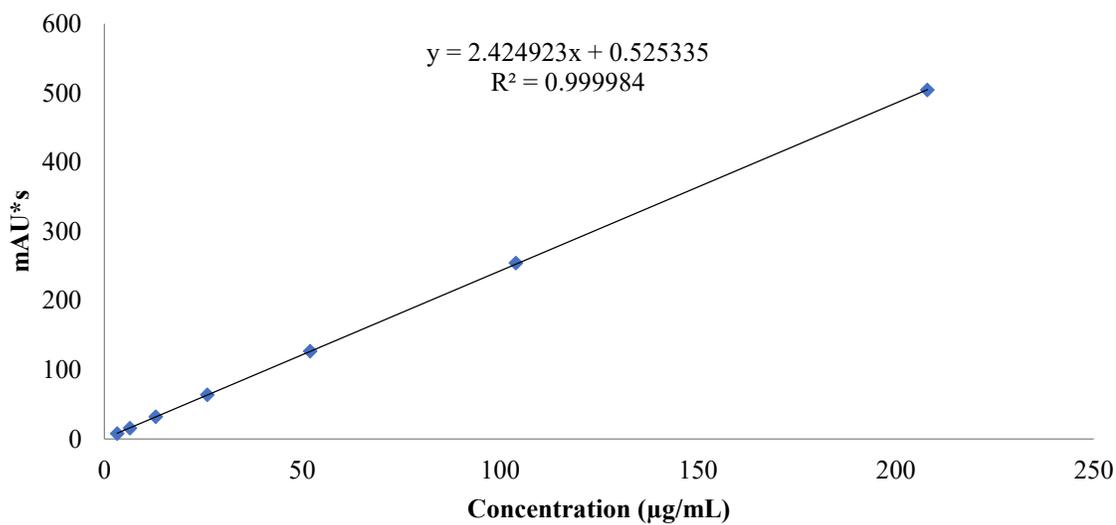


Figure 54 : Courbe d'étalonnage de la balsacone A 25 à 265 nm

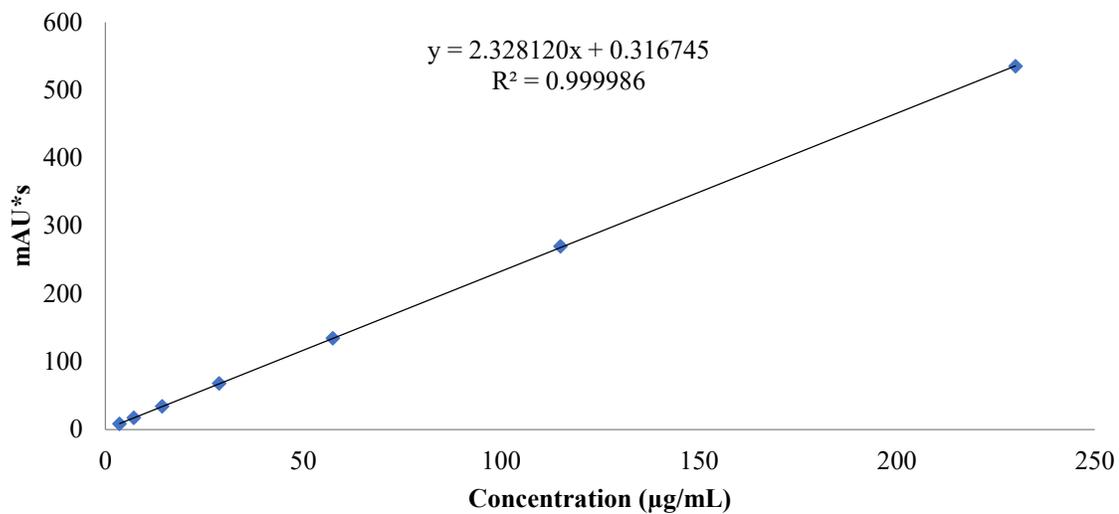


Figure 55 : Courbe d'étalonnage de la balsacone B 26 à 265 nm

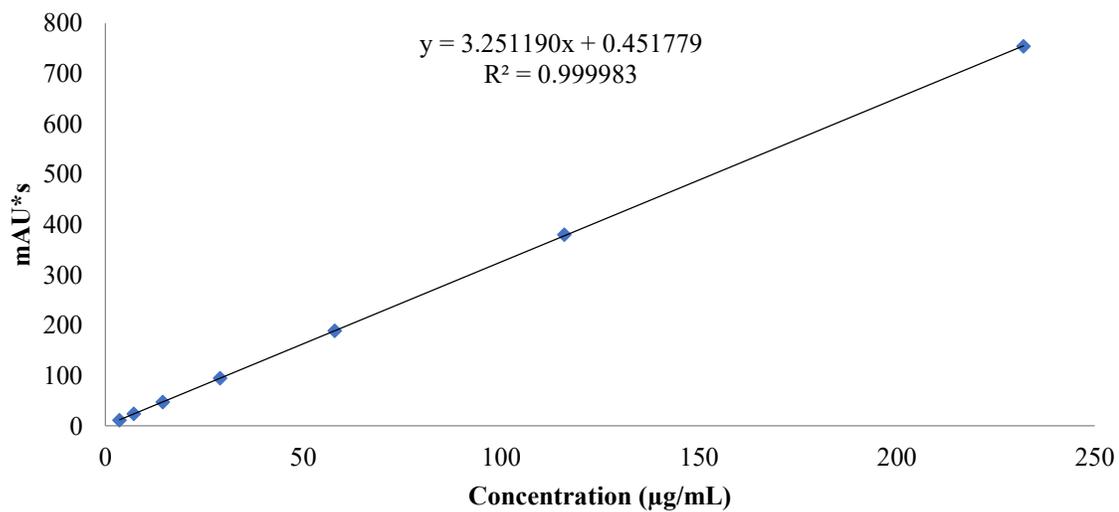


Figure 56 : Courbe d'étalonnage de la balsacone C 27 à 265 nm

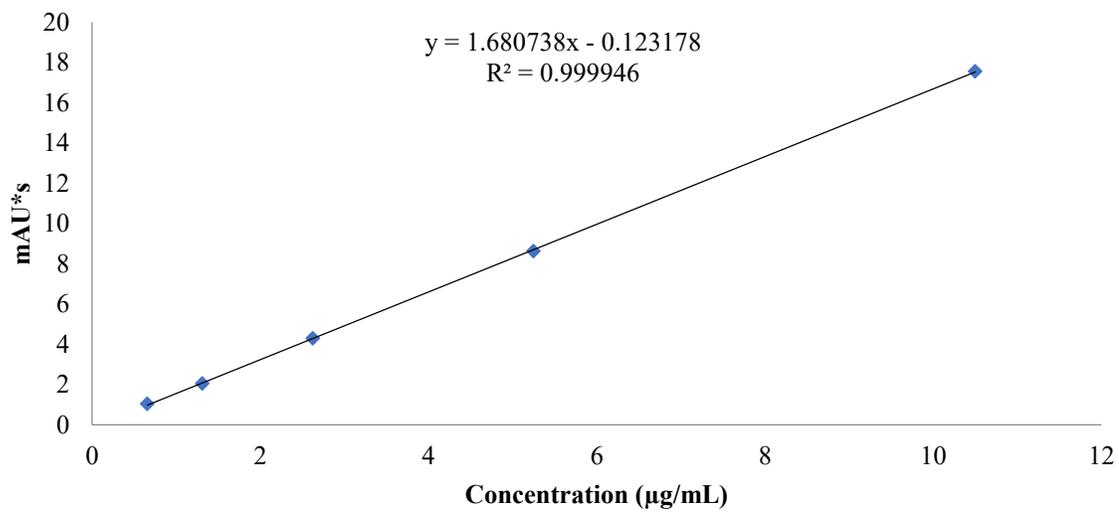


Figure 57 : Courbe d'étalonnage de la balsacone K 28 à 265 nm

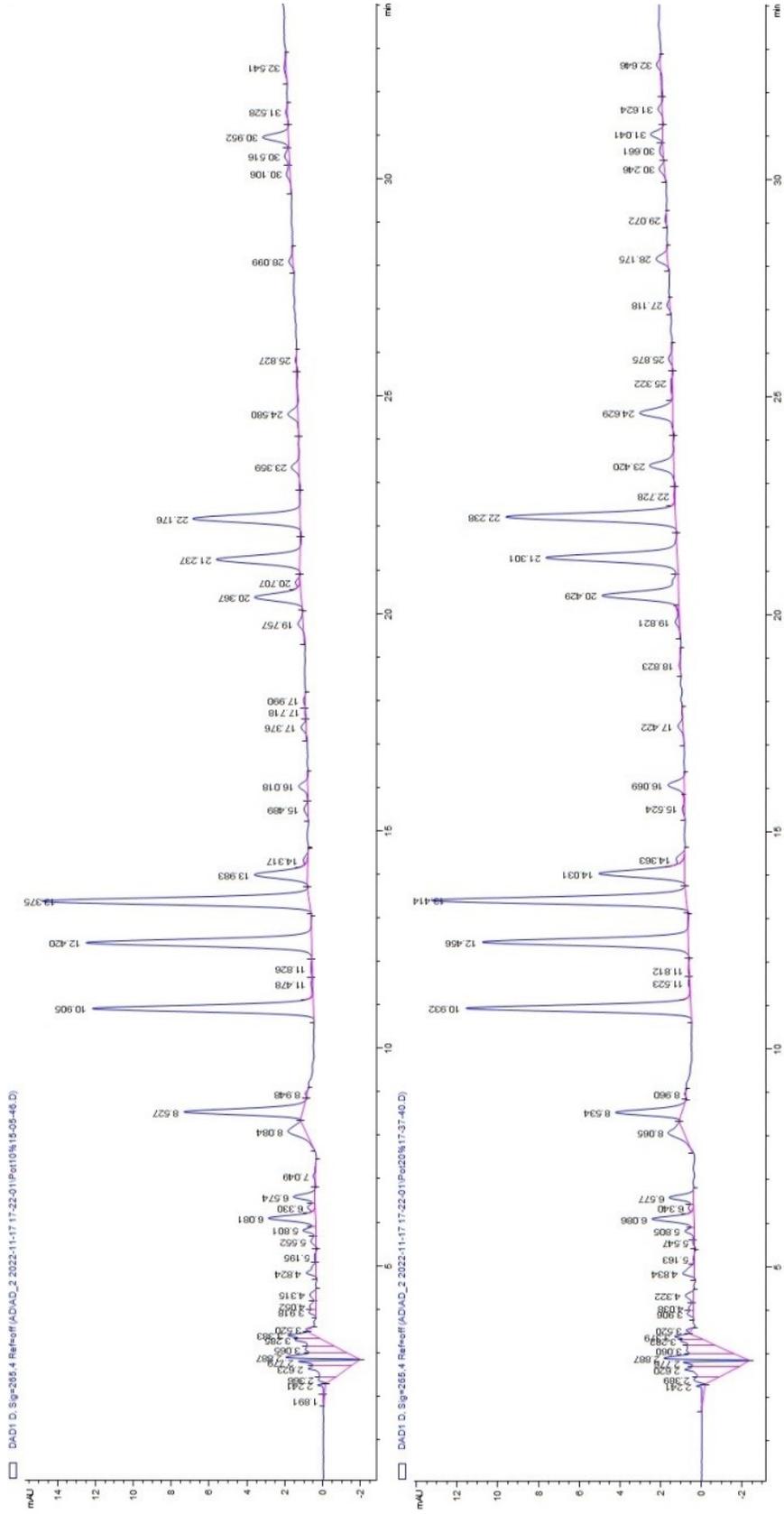


Figure 59 : Chromatogrammes CLHP des fractions P2 (en haut) et P3 (en bas) à 265 nm

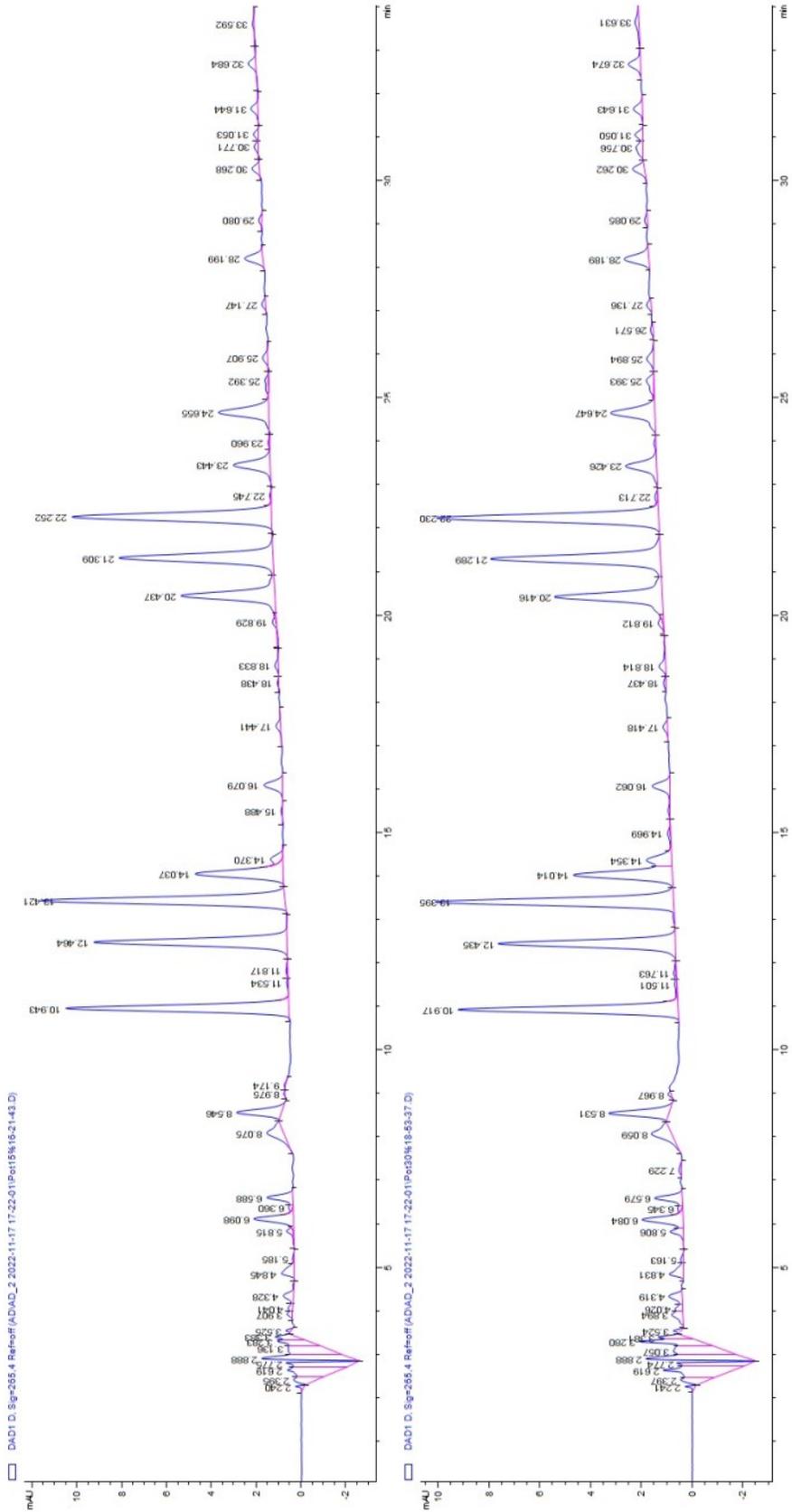


Figure 60 : Chromatogrammes CLHP des fractions **P4** (en haut) et **P5** (en bas) à 265 nm

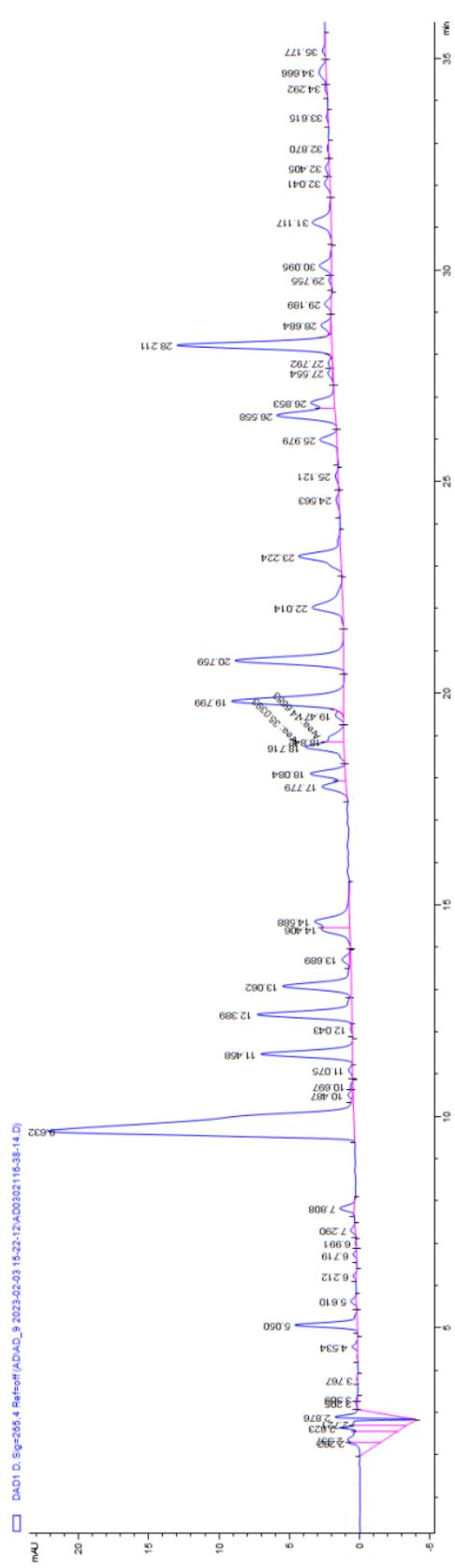
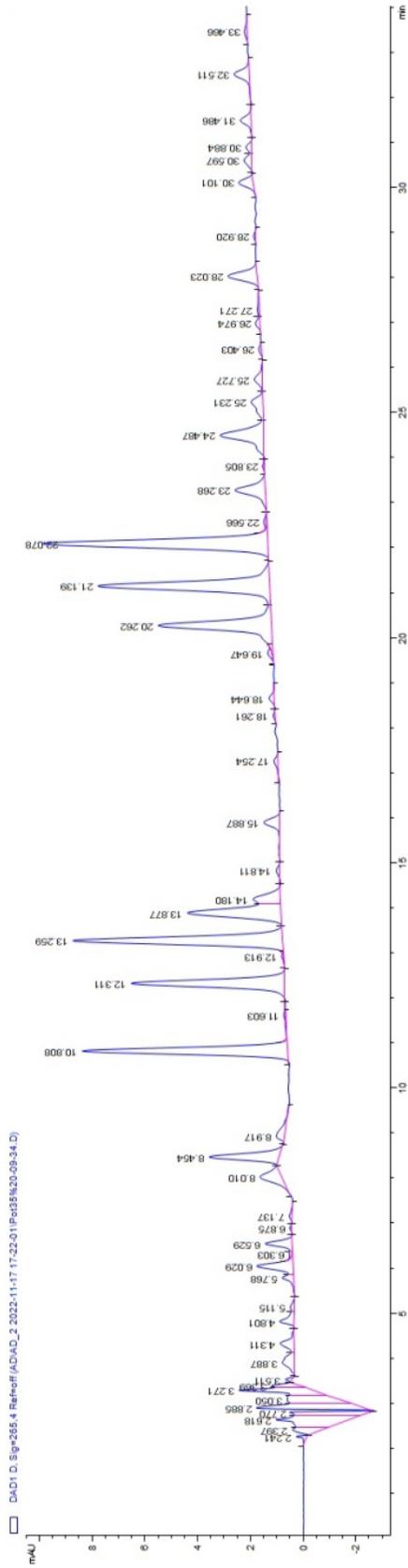


Figure 61 : Chromatogrammes CLHP de la fraction P6 (en haut) et du brut d'extraction (en bas) à 265 nm

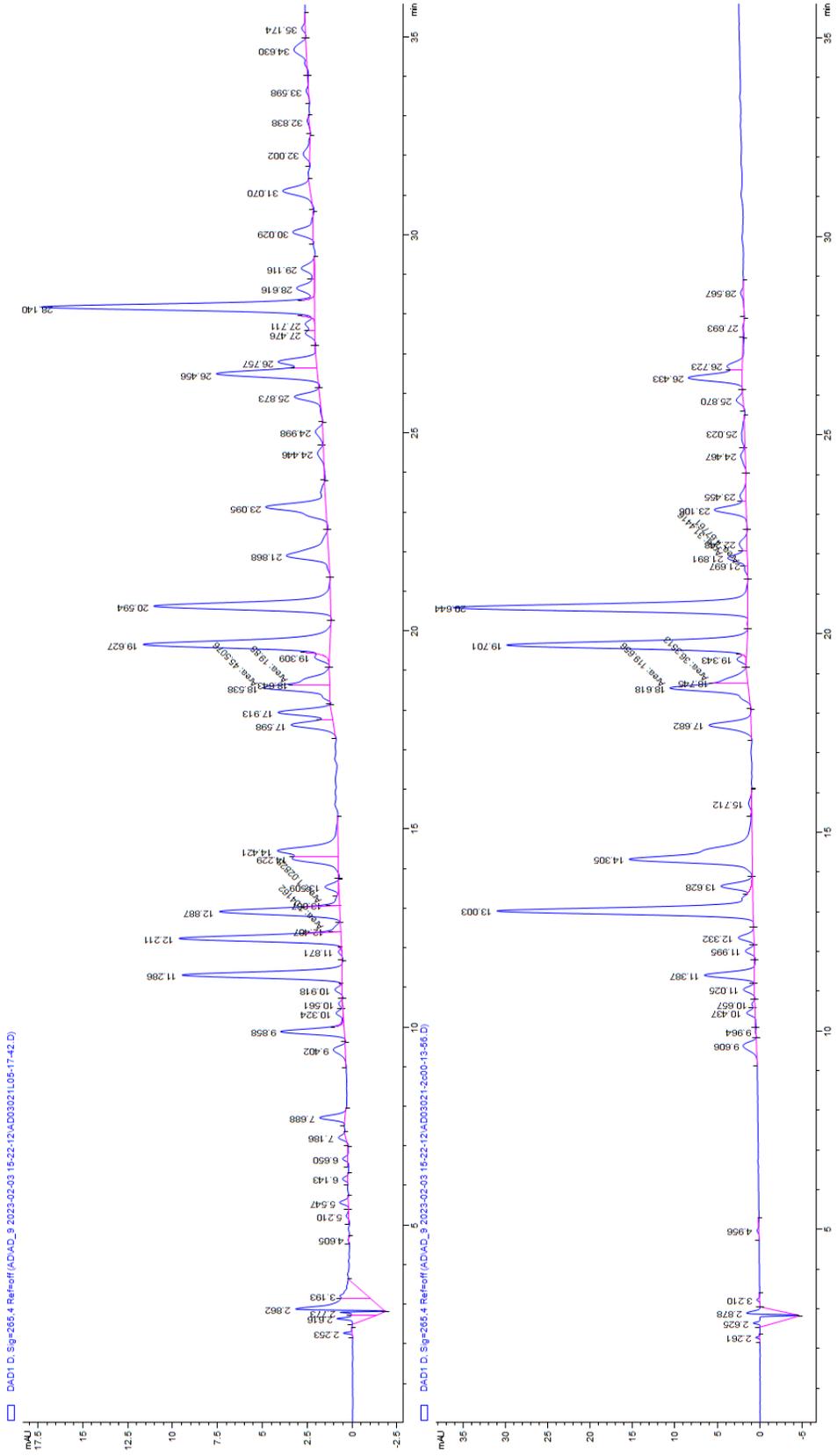


Figure 62 : Chromatogrammes CLHP du brut d'extraction lavé (en haut) et de la fraction C (en bas) à 265 nm

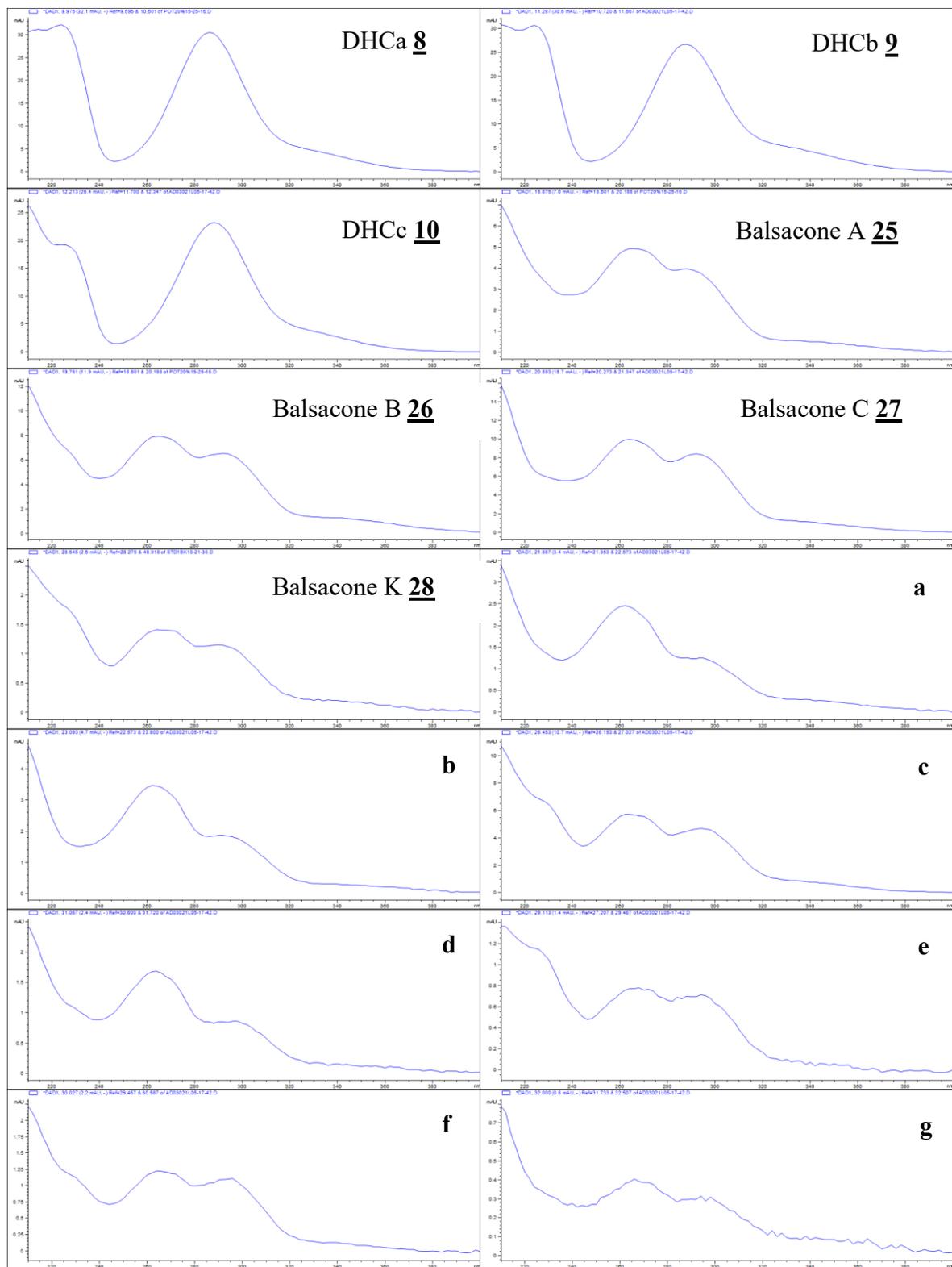


Figure 63 : Spectres d'absorption des DHC **8** à **10**, des balsacones **25** à **28** et des signaux des composés **a** à **g** de 200 à 400 nm