



Pharmacomodulation de dihydrochalcones biosourcées

par Marie-Lee Audet

**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)**

Québec, Canada

RÉSUMÉ

L'antibiorésistance est un enjeu de santé publique notamment causée par l'utilisation inadéquate et abusive des antibiotiques. Elle survient lorsqu'un agent antibactérien ne parvient plus à éliminer les bactéries ou échoue à freiner leur croissance. L'incidence sur le traitement des infections bactériennes pose un problème inquiétant au niveau mondial. Face à ce défi sanitaire, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques représente une prise d'action conséquente. Dans le cadre de travaux menés au laboratoire LASEVE de l'Université du Québec à Chicoutimi, une nouvelle famille de dihydrochalcones (DHCs) cinnamylées a été isolée à partir de l'extrait éthanolique des bourgeons de *Populus balsamifera*. Ces molécules, nommées balsacones, ont démontré une activité intéressante contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Les balsacones ne semblent pas induire de résistance chez les bactéries traitées, une caractéristique qui rend leur étude particulièrement pertinente. Malheureusement, le rendement d'isolation des balsacones est faible, ce qui limite les perspectives de développement de ces composés malgré leurs propriétés prometteuses. Afin de pallier cette limitation, une approche originale pour la préparation de balsacones a été développée. La méthode mise au point se base sur l'alkylation de Friedel-Crafts catalytique de DHCs biosourcées non protégées. L'accès à ces précurseurs représente toutefois un obstacle. L'asébotine, un glycoside de DHC, est un composé retrouvé en abondance dans les parties aériennes de *Kalmia angustifolia*. Cette plante de la famille des Éricaceae est considérée comme indésirable dans plusieurs écosystèmes, forestiers ou agricoles, en raison de sa prolifération qui fait compétition avec d'autres espèces. L'utilisation de *K. angustifolia* comme matière première renouvelable dans la production de balsacones donnerait ainsi de la valeur ajoutée à cette plante indésirable.

Dans ce projet de maîtrise, deux stratégies ont été évaluées pour accéder à des DHCs entrant dans la production des balsacones et de leurs analogues. D'une part, l'extraction de l'asébotine, une DHC glycosylée présente dans les parties aériennes de *K. angustifolia*, a été optimisée en faisant varier la température d'extraction, en dosant le composé durant le procédé et en ajustant le fractionnement de l'extrait pour obtenir l'asébogénine, précurseur de la balsacone A. L'asébogénine a ainsi été obtenue avec un rendement global de 0,6 % m/m à partir de 200 g de plantes séchées. D'autre part, les propriétés biologiques d'un extrait de bourgeons de *P. balsamifera* ont été améliorées en réalisant l'hémisynthèse d'analogues de balsacones directement dans l'extrait. Différents alcools cinnamiques et benzyliques ont été utilisés pour former des balsacones et des analogues. Tous les extraits modifiés se sont avérés actifs contre *S. aureus* à des concentrations non toxiques pour les fibroblastes humains normaux (WS-1). De plus, la modulation dans l'extrait avec l'alcool 4-méthoxybenzylique semble favoriser une activité antibactérienne supérieure à celle de l'extrait enrichi en balsacones avec des concentrations minimales qui inhibent 90 % de la croissance bactérienne (CIM₉₀) sur deux expériences de $4,0 \pm 0,7$ µg/mL et $3,8 \pm 0,1$ µg/mL contre $7,4 \pm 0,1$ µg/mL et $6,8 \pm 0,5$ µg/mL pour la fraction enrichie en balsacones. Ces travaux pourront faciliter la pharmacomodulation des balsacones et contribuer à la lutte contre les bactéries pathogènes résistantes.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES SCHÉMAS	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	5
REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1.1 ANTIBIOTIQUES ET RÉSISTANCE	5
1.1.1 CLASSES D'ANTIBIOTIQUES	5
1.1.2 ÉMERGENCE DES BACTÉRIES RÉSISTANTES : LE CAS DU <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RÉSISTANT À LA MÉTHICILLINE	6
1.1.3 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DU SARM	7
1.2 FACTEURS FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE	7
1.3 IMPACTS DE LA RÉSISTANCE	8
1.4 LES BALSACONES	9
1.4.1 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES	9
1.4.2 SYNTHÈSE TOTALE	10
1.4.2.1 BALSACONE A	10
1.4.2.2 BALSACONES B ET C	13
1.4.3 HÉMISYNTHÈSE VERTE	15
1.4.3.1 DISPONIBILITÉ DES PRÉCURSEURS	16
1.4.4 OBJECTIFS DE RECHERCHE	17
CHAPITRE 2	18
RÉSULTATS ET DISCUSSION	18
2.1 VOLET 1 : VALORISATION DES PARTIES AÉRIENNES DE <i>K. ANGUSTIFOLIA</i>	18
2.1.1 OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION	18
2.1.2 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE <i>K. ANGUSTIFOLIA</i>	19
2.1.3 HYDROLYSE DE L'ASÉBOTINE	20
2.2 VOLET 2 : MODIFICATION DE L'EXTRAIT DU BOURGEON DE <i>POPULUS BALSAMIFERA</i>	21
2.2.1 EXTRACTION DES BOURGEONS	22
2.2.2 OBTENTION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES	22
2.2.3 SYNTHÈSE DES ALCOOLS	23
2.2.4 HÉMISYNTHÈSE DE BALSACONES	25
2.2.5 PHARMACOMODULATION DANS L'EXTRAIT	28
2.2.6 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE	32
CHAPITRE 3	35
MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
3.1 GÉNÉRALITÉS	35

3.2 MÉTHODES D'ANALYSES INSTRUMENTALES	35
3.2.1 HPLC ANALYTIQUE.....	35
3.2.2 LC-MS	36
3.2.3 RMN	37
3.3 VOLET 1 : PRODUCTION D'ASÉBOGÉNINE À PARTIR DE <i>K. ANGUSTIFOLIA</i>	37
3.3.1 DOSAGE DE L'ASÉBOTINE DANS LES PARTIES AÉRIENNES DE <i>K. ANGUSTIFOLIA</i>	37
3.3.2 EXTRACTION DES PARTIES AÉRIENNES	38
3.3.3 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE <i>K. ANGUSTIFOLIA</i>	38
3.3.4 HYDROLYSE DE L'ASÉBOTINE	39
3.4 VOLET 2 : MODIFICATION DE L'EXTRAIT DU BOURGEON DE <i>POPULUS BALSAMIFERA</i> ET PHARMACOMODULATION DE BALSACONES.....	40
3.4.1 EXTRACTION DES BOURGEONS.....	40
3.4.2 OBTENTION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES.....	40
3.4.3 SYNTHÈSE DES ALCOOLS 3,4-DIMÉTHOXYCINNAMIQUE (<u>28</u>) ET 4-MÉTHOXYCINNAMIQUE (<u>29</u>).....	41
3.4.4 MODIFICATION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES (CP).....	43
CONCLUSION	52
LISTE DE RÉFÉRENCES.....	53
ANNEXE 1.....	58
ANNEXE 2.....	59
ANNEXE 3.....	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Catégorisation des classes d'antibiotiques par leur mode d'action	5
Tableau 2. Dosage de l'asébotine au cours de l'extraction des parties aériennes de <i>K. angustifolia</i> dans l'éthanol 95 % avec chauffage (reflux) et sans chauffage (ambiant)	18
Tableau 3. Activité antibactérienne des fractions mères (AP2 = extrait lavé; CP = fraction riche en dihydrochalcones) et modifiées (DP2 = fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique; EP = fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique; FP = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique; GP = fraction modifiée avec l'alcool cinnamique; HP = fraction modifiée avec l'alcool coniférylique; IP = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique; JP = fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique)	32
Tableau 4. Cytotoxicité des fractions mères (AP2, CP) et modifiées (DP2 ; EP-JP) sur les fibroblastes humains (WS-1).....	34
Tableau 5. Gradient d'élution de la méthode HPLC analytique	36
Tableau 6. Gradient d'élution de la méthode LC-MS.....	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structures de la pénicilline G et de la méthicilline.	6
Figure 2. a) Structures des balsacones A, B et C (1a-c), le motif 4-hydroxycinnamique est mis en évidence en rouge ; b) structure des dihydrochalcones précurseurs (2a-c).	9
Figure 3. Structure de l'asébotine (27).	16
Figure 4. Schéma de principe du projet : production d'asébogénine (2a) et conversion de dihydrochalcones (2a-c) en différents dérivés aux propriétés variées.	17
Figure 5. Schéma de production d'asébogénine (2a) à partir des parties aériennes de <i>K. angustifolia</i>	19
Figure 6. CCM (phase normale) des étapes de production de l'asébogénine (2a) à partir de l'extrait brut de <i>K. angustifolia</i> avec l'asébotine (27) comme référence. Milieu d'élution : CHCl ₃ /MeOH (9/1) ; révélation : H ₂ SO ₄ (20 % dans MeOH), lumière visible.	20
Figure 7. Schéma d'isolation d'un extrait riche en dihydrochalcones (2a-c) à partir des bourgeons de <i>Populus balsamifera</i>	22
Figure 8. Chromatogrammes du fractionnement de l'extrait lavé ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (2a-c) et celui en rouge la zone des balsacones (1a-c).	23
Figure 9. Alcools cinnamiques (26 ; 28-31) et benzyliques (32-33) utilisés pour la modification de la fraction riche en dihydrochalcones (CP).	24
Figure 10. Chromatogrammes de la fraction riche en DHCs (CP) et de la fraction enrichie en balsacones avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (DP2) ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (2a-c) et celui en rouge la zone des balsacones (1a-c).	26
Figure 11. Optimisation de la production des balsacones 1a-c à partir de la fraction riche en DHCs (CP) modifiée avec différents pourcentages d'alcool 4-hydroxycinnamique; 10 % m/m (DP1), 20 % m/m (DP2) et 30 % m/m (DP3).	27
Figure 12. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (IP). Les rapports m/z des analogues formés (46a-c) sont indiqués au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (2a-c), celui en rouge la zone des balsacones (1a-c) et celui en bleu la zone des analogues.	30
Figure 13. Formation d'analogues de balsacones (42-47a ; 42-47b ; 42-47c) à partir de la fraction riche en DHCs (CP). DP2 = fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique; EP = fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique; FP = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique; GP = fraction modifiée avec l'alcool cinnamique; HP = fraction modifiée avec l'alcool coniférylique; IP = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique; JP = fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique.	31
Figure 14. Courbe d'étalonnage du dosage de l'asébotine dans l'extrait brut des parties aériennes de <i>K. angustifolia</i>	38
Figure 15. Structures des balsacones A, B et C formées dans les fractions enrichies en balsacones DP1 , DP2 et DP3	43

- Figure 16. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 10 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP1**). Les rapports m/z des balsacons (**1a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**). $t_r = 17,5$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 18,2$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 19,0$ min, m/z 389,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₅, 389,15)..... 44
- Figure 17. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP2**). Les rapports m/z des balsacons (**1a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**). $t_r = 17,5$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 18,2$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 19,0$ min, m/z 389,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₅, 389,15)..... 44
- Figure 18. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 30 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP3**). Les rapports m/z des balsacons (**1a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**). $t_r = 17,5$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 18,2$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_r = 19,0$ min, m/z 389,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₅, 389,15)..... 45
- Figure 19. Structures hypothétiques des analogues 3,4-diméthoxycinnamiques formés dans la fraction **EP**. 45
- Figure 20. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (**EP**). Les rapports m/z des analogues (**42a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**42a-c**). $t_r = 21,6$ min, m/z 463,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₇H₂₇O₇, 463,18); $t_r = 22,5$ min, m/z 463,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₇H₂₇O₇, 463,18); $t_r = 23,3$ min, m/z 433,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₆H₂₅O₆, 433,17)..... 45
- Figure 21. Structures hypothétiques des analogues 4-méthoxycinnamiques formés dans la fraction **FP**. 46
- Figure 22. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique (**FP**). Les rapports m/z des analogues (**43a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**43a-c**). $t_r = 24,6$ min, m/z 433,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₆H₂₅O₆, 433,17); $t_r = 25,2$ min, m/z 433,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₆H₂₅O₆, 433,17); $t_r = 25,9$ min, m/z 403,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₅, 403,16)..... 46
- Figure 23. Structures hypothétiques des analogues cinnamiques formés dans la fraction **GP**. 47
- Figure 24. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool cinnamique (**GP**). Les rapports m/z des analogues (**44a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**44a-c**). $t_r = 23,7$ min, m/z 403,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₅, 403,16); $t_r = 26,0$ min, m/z 403,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₅, 403,16); $t_r = 27,0$ min, m/z 373,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₄, 373,15)..... 47
- Figure 25. Structures hypothétiques des analogues coniféryliques formés dans la fraction **HP**..... 48
- Figure 26. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool coniférylique (**HP**). Les rapports m/z des analogues (**45a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**45a-c**). $t_r = 19,0$ min, m/z

449,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₆H₂₅O₇, 449,17); t_r = 19,0 min, m/z 449,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₆H₂₅O₇, 449,17); t_r = 19,7 min, m/z 419,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16). 48

Figure 27. Structures hypothétiques des analogues 4-méthoxybenzyliques formés dans la fraction **IP**. 49

Figure 28. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (**IP**). Les rapports m/z des analogues (**46a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**46a-c**). t_r = 21,0 min, m/z 407,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₃O₆, 407,16); t_r = 21,8 min, m/z 407,7 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₃O₆, 407,16); t_r = 22,6 min, m/z 377,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₃H₂₁O₅, 377,15). 49

Figure 29. Structures hypothétiques des analogues 2-hydroxybenzyliques formés dans la fraction **JP**. 50

Figure 30. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique (**JP**). Les rapports m/z des analogues (**47a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**47a-c**). t_r = 20,9 min, m/z 393,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₃H₂₁O₆, 393,14); t_r = 20,8 min, m/z 393,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₃H₂₁O₆, 393,14); t_r = 21,7 min, m/z 363,6 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₂H₁₉O₅, 363,13). 50

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1. Synthèse totale de l'asébogénine à partir de précurseurs simples.	11
Schéma 2. Synthèse d'un précurseur protégé de la balsacone A.	12
Schéma 3. Synthèse des dihydrochalcones précurseurs des balsacones B et C (2b-c) à partir de la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (16)	13
Schéma 4. Synthèse du bromure de cinnamyle protégé.	14
Schéma 5. Alkylation des dihydrochalcones trihydroxylées (2b-c) par le bromure de cinnamyle protégé (24) et déprotection des molécules (25a et 25b) pour obtenir les balsacones B (1b) et C (1c).	14
Schéma 6. Hémisynthèse de balsacones (1a-c) par alkylation de Friedel-Crafts de DHCs (2a-c) avec l'alcool 4-hydroxycinnamique (26).	15
Schéma 7. Hydrolyse de l'asébotine (27) présente dans la fraction BK2 en conditions acides.	21
Schéma 8. Synthèse des alcools ; a) 3,4-diméthoxycinnamique (28) et b) 4-méthoxycinnamique (29).	24
Schéma 9. Hémisynthèse de balsacones (1a-c) par alkylation de Friedel-Crafts.	25
Schéma 10. Mécanisme réactionnel d'hémisynthèse de balsacones antibactériennes.	26
Schéma 11. Mécanisme réactionnel de la formation de la balsacone K (41).	28
Schéma 12. Modification de la fraction riche en DHCs (CP) avec différents alcools cinnamiques (28-31) et benzyliques (32-33). a) fraction EP ; b) fraction FP ; c) fraction GP ; d) fraction HP ; e) fraction IP ; f) fraction JP	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APTS :	acide paratoluènesulfonique
CCM :	chromatographie sur couche mince
CMI :	concentration minimale inhibitrice
CMI ₉₀ :	concentration minimale inhibitrice de 90 % de la croissance cellulaire
d :	doublet
DHC :	dihydrochalcone
DIBAL-H :	hydruire de diisobutylaluminium
DIPEA :	diisopropyléthylamine
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide
Glu :	glucose
HPLC :	chromatographie liquide haute performance
LC-MS :	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
IC ₅₀ :	concentration inhibitrice de 50 % de la croissance cellulaire
LASEVE :	Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales
m :	multiplet
MeOH :	méthanol
MOM :	groupement protecteur méthoxyméthyle
MOM-Cl :	chlorométhoxyméthane
PLP :	protéine de liaison des pénicillines
ppm :	partie par million
RMN :	résonance magnétique nucléaire
s :	singulet
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
t :	triplet
TA :	température ambiante
TBAF :	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBDMS :	chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
THF :	tétrahydrofurane
t _R :	temps de rétention
UQAC :	Université du Québec à Chicoutimi
UV :	ultraviolet

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail de recherche a été marquée par l'apport de nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son succès. Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude envers mon directeur de maîtrise, le professeur Jérôme Alsarraf, pour son soutien constant, à la fois à titre d'expert et en tant qu'humain. Son professionnalisme, sa générosité et son énergie contagieuse figurent parmi les qualités qui font de lui un chercheur et pédagogue exemplaire, grandement apprécié de tous. Je lui suis immensément reconnaissante pour tous ses conseils, le partage de son expertise et sa confiance qui me conduiront avec assurance à la prochaine étape de mon parcours.

Je souhaite aussi remercier le professeur André Pichette à la codirection de cette maîtrise. L'appui reçu de sa part et son accueil au laboratoire LASEVE ont permis une expérience d'apprentissage enrichissante remplie d'opportunités.

Je tiens également adresser mes remerciements aux professeurs Jean Legault (codirection) et Serge Lavoie, au Dr Balla Sylla, à Josianne Savard, Catherine Dussault, Karl Girard-Lalancette, Francine Nagau-Lavoie, Caroline Potvin, François Lapierre, Tommy Perron et Antoine Desportes pour leur précieuse aide dans divers aspects de ce projet, ainsi qu'à toute l'équipe étudiante du LASEVE que j'ai eu le privilège de côtoyer tout au long de ma maîtrise.

À mon coloc de hotte et ami Jean-Christophe, ce fut un plaisir d'avoir traversé ces dernières années d'études en ta compagnie, en partageant de nombreux fous rires et moments de complicité, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur laboratoire.

Je voudrais remercier chaleureusement ma famille, mes amis et mon amoureux, Alexandre, pour m'avoir encouragée dans les moments plus difficiles et pour m'avoir accompagnée dans la célébration des meilleurs.

Pour finir, je dédie une mention toute spéciale à mon papa. Du fond du cœur, merci d'avoir offert à ta fille au-delà de tout le soutien, les ressources et l'amour nécessaires pour qu'elle puisse être là où elle est aujourd'hui. J'aurais adoré que tu puisses me lire.

INTRODUCTION

Les antibiotiques représentent l'arme de choix pour combattre les infections bactériennes. Leur action souvent sélective et leur efficacité ont grandement contribué à l'augmentation de l'espérance de vie depuis leur découverte.¹ Néanmoins, les bactéries pathogènes demeurent un enjeu de santé publique persistant. En effet, l'antibiorésistance est un phénomène qui a été fortement aggravé par l'utilisation excessive et inadéquate des antibiotiques au fil du temps.² Elle correspond au renforcement de la défense des bactéries contre les effets bactéricides ou inhibiteurs de croissance des médicaments. La résistance aux antibiotiques représente un problème spécialement important en milieu hospitalier où le succès de plusieurs interventions courantes dépend de l'efficacité des antibactériens.³ Le problème devient d'autant plus préoccupant lorsque la multirésistance, c'est-à-dire la capacité des bactéries à développer une résistance vis-à-vis plusieurs familles d'antibiotiques à la fois, entre en jeu, limitant davantage les options thérapeutiques disponibles. Par exemple, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), un staphylocoque multirésistant commun, est l'une des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales et communautaires.⁴ Seulement six bactéries sont responsables de la majorité des décès associées à la résistance : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.⁵ L'Organisation mondiale de la santé a déclaré l'émergence de la résistance aux antibiotiques comme une menace prioritaire pour l'humanité.⁶ Dans ce contexte, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques devient souhaitable pour lutter contre les bactéries pathogènes résistantes.

Les produits naturels, par leurs structures complexes et diversifiées, sont une source privilégiée pour l'identification et l'élaboration de nouveaux médicaments. Par ailleurs, six des neuf principales

classes d'antibiotiques ont des squelettes d'origine naturelle : les β -lactamines, les glycopeptides, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides et les lincosamides.⁷

Récemment, des travaux menés au Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC) ont permis d'isoler une famille de dihydrochalcones (DHCs) cinnamylées, nommées balsacones, à partir de l'extrait éthanolique des bourgeons de *Populus balsamifera*.⁸ Les balsacones ont démontré une activité antimicrobienne significative, notamment contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.⁹ Elles agissent en perturbant la membrane cellulaire des bactéries.¹⁰ De manière surprenante, les balsacones n'entraînent pas de résistance chez les bactéries traitées. Cette caractéristique les rend particulièrement pertinentes pour la lutte contre la résistance aux antibiotiques. De plus, une étude semble démontrer qu'elles présentent également un intérêt pour le traitement topique du psoriasis.¹¹ Cependant, le rendement d'extraction des balsacones depuis les bourgeons de *P. balsamifera* est très faible, de l'ordre de la dizaine de milligrammes par kilogramme de matière végétale⁸, ce qui limite les possibilités de développement de ces composés.

Comme alternative, des chercheurs ont tenté de réaliser la synthèse totale des balsacones.^{12, 13} Ces méthodes de synthèse multi-étapes peuvent être complexes, nécessitent l'emploi de groupements protecteurs et les réactifs utilisés sont généralement toxiques pour la santé ou encore nuisibles pour les écosystèmes. Une nouvelle voie de production des balsacones a donc été imaginée. Cette approche, étudiée dans les laboratoires de l'UQAC, consiste à assembler des précurseurs biosourcés par alkylation de Friedel-Crafts pour obtenir des balsacones en une seule étape catalytique et sans groupements protecteurs.¹⁴ À la différence de la synthèse multi-étapes qui recourt à des précurseurs pétrochimiques simples, cette approche permet de former rapidement des composés à haute valeur ajoutée et aux structures inédites en s'appuyant sur la complexité et la diversité des molécules naturelles.¹⁵ La méthode répond à plusieurs principes de la chimie verte grâce à l'utilisation de précurseurs renouvelables, la catalyse de la réaction et l'économie d'étapes de synthèse et de ressources pour accéder au produit final. L'emploi de réactifs halogénés nocifs communément retrouvés dans ce type de transformations est également évité.¹⁶ Dans son ensemble, le protocole

d'alkylation présente de nombreux avantages. L'enjeu de cette approche de production verte est l'accès aux dihydrochalcones naturelles qui constituent une famille de produits naturels relativement rares.

L'asébotine, un glycoside de DHC, est un composé retrouvé en grande quantité dans les parties aériennes de *Kalmia angustifolia*.¹⁷ Le kalmia à feuilles étroites est une Éricacée qui prolifère dans la forêt boréale canadienne.¹⁸ Sa présence est toutefois considérée comme indésirable dans les sites ayant subi des perturbations car elle nuit au reboisement en entrant en compétition avec les jeunes arbres pour les nutriments et la lumière.^{19,20} Cette plante représente également un enjeu en agriculture, notamment dans les bleuetières où elle contribue à réduire le rendement en fruits des récoltes. Conventionnellement, la présence nuisible d'une espèce végétale peut être résolue par l'emploi d'herbicides, lesquels peuvent être nocifs pour l'environnement et pour la santé humaine.^{21,22} Une autre solution pour contenir sa croissance en milieu agricole consiste à l'arracher simplement, une méthode coûteuse en temps et en énergie pour une biomasse qui ne génère pas de valeur ajoutée. L'utilisation de *K. angustifolia* en tant que matière première renouvelable pour former des balsacones antibactériennes donnerait ainsi de la valeur ajoutée à une plante indésirable et permettrait d'améliorer sa gestion dans les secteurs forestier et agricole. Des travaux préliminaires ont également montré que les balsacones peuvent être synthétisées directement dans un extrait de bourgeons de *P. balsamifera* (résultats non publiés). Cette modification se traduit par une augmentation des propriétés antibactériennes de l'extrait.

Dans l'optique de participer au développement de nouvelles solutions pour combattre les bactéries résistantes, ce travail de maîtrise a pour objectif d'étudier deux approches qui faciliteront la pharmacomodulation des balsacones. Il s'agit, d'une part, d'optimiser l'extraction d'une DHC glycosylée présente dans *K. angustifolia* pour produire l'asébogénine précurseur de la balsacone A et, d'autre part, d'améliorer l'activité biologique de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* en réalisant l'hémisynthèse *in situ* d'analogues de balsacones. Ce mémoire comporte quatre sections. Le premier chapitre introduit le sujet de recherche sous forme de revue de littérature en présentant la problématique globale, les travaux antérieurs sur lesquels est basée cette étude et les enjeux qui

y sont liés. Le deuxième chapitre, divisé en deux volets selon les objectifs du projet de recherche, présente les résultats obtenus et leur interprétation, ainsi que les réactions et mécanismes pour la production des molécules d'intérêt. Le troisième chapitre décrit en détail les modes opératoires, de l'extraction du matériel végétal aux transformations chimiques, en passant par les méthodes analytiques. Pour finir, la quatrième partie permet de conclure cet ouvrage et de proposer des perspectives de poursuite du travail de recherche.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 ANTIBIOTIQUES ET RÉSISTANCE

1.1.1 CLASSES D'ANTIBIOTIQUES

La majorité des grandes classes d'antibiotiques ont été découvertes entre les années 1940 et 1960, période marquée dans l'Histoire comme l'« âge d'or » des antibiotiques.²³ Au Canada, la plus importante diminution du nombre de décès attribuables à des maladies infectieuses a été enregistrée au cours de ces deux décennies.²⁴ Parmi les neuf principales classes d'antibiotiques, six ont des squelettes d'origine naturelle : les β -lactamines, les glycopeptides, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides et les lincosamides.⁷ Les sulfamides, les quinolones et les oxazolidinones, quant à eux, ont été entièrement conçus par voie synthétique. La plupart des antibiotiques ciblent les bactéries de manière spécifique en perturbant leur structure ou un processus crucial pour leur croissance et/ou leur survie.^{25,26} Le **Tableau 1** résume la classification des grandes familles d'antibiotiques selon leur mode d'action.

Tableau 1. Catégorisation des classes d'antibiotiques par leur mode d'action^{7, 23}

Classes	Modes d'action	Origine	Exemples
β-lactamines	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Naturelle	Pénicilline G
Glycopeptides		Naturelle	Vancomycine
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse protéique	Naturelle	Tétracycline
Aminoglycosides		Naturelle	Gentamicine
Macrolides		Naturelle	Érythromycine
Lincosamides		Naturelle	Clindamycine
Oxazolidinones		Synthétique	Linézolide
Quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Synthétique	Ciprofloxacine
Sulfamides	Inhibition de la synthèse de l'acide folique	Synthétique	Sulfaméthizole

1.1.2 ÉMERGENCE DES BACTÉRIES RÉSISTANTES : LE CAS DU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANT À LA MÉTHICILLINE

La résistance antibactérienne peut être décrite comme la capacité intrinsèque ou acquise des bactéries à résister à un traitement antibiotique.²⁷ La pénicilline, un antibiotique de la famille des β -lactamines, a été découverte par Sir Alexander Fleming en 1928.²⁸ Isolée pour la première fois en 1942, la pénicilline G, ou benzylpénicilline (**Figure 1**) est devenue disponible au grand public dès 1945 pour le traitement de nombreuses infections bactériennes.^{29,30}

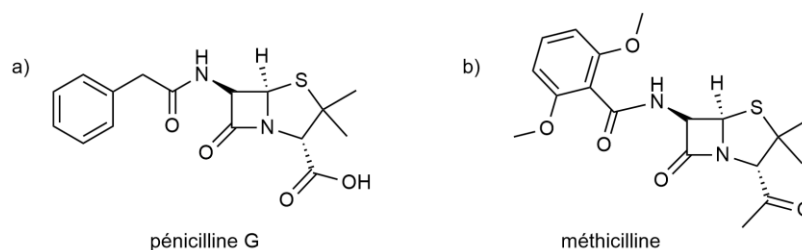


Figure 1. Structures de la pénicilline G et de la méthicilline.

Peu de temps après sa découverte, les premiers signes de résistance à la pénicilline ont été rapportés lorsque Abraham et Chain ont identifié une enzyme de type β -lactamase, la pénicillinase, capable de neutraliser l'effet de ce médicament dans une souche d'*Escherichia coli*.³¹ Par la suite, la détection de quatre souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline chez des patients hospitalisés a rendu évidente la propagation de la résistance.³² Au cours des années suivantes, le nombre d'infections causées par les souches résistantes de *S. aureus* a rapidement augmenté, autant dans les hôpitaux que dans les communautés. Les dégâts résultant de l'inefficacité de la pénicilline contre *S. aureus* ont été freinés temporairement, en 1961, par l'introduction de la méthicilline (**Figure 1**), une β -lactamine semi-synthétique dont l'action n'est pas entravée par la pénicillinase.³³ Cependant, les débuts de l'administration clinique de la méthicilline ont aussitôt été suivis par l'identification de souches de *S. aureus* lui résistant.³⁴ Depuis, les infections provoquées par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) sont observables à travers le monde tandis que ses souches se sont répandues en dehors du milieu hospitalier. Au fil des ans, l'utilisation

prolongée de divers antibiotiques a également entraîné le développement de la multirésistance chez le SARM³⁵, ce qui limite davantage les choix de traitement.

1.1.3 MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DU SARM

Ce n'est que vingt ans après l'émergence des souches de SARM que son mécanisme de résistance à la méthicilline a été élucidé.³² À la manière de plusieurs autres bactéries à Gram positif contre les β -lactamines, ce mécanisme consiste à modifier la cible d'action de l'antibiotique en altérant la structure et/ou le nombre de protéines de liaison des pénicillines (PLP).³⁶ Les PLP sont essentielles à la synthèse du peptidoglycane, un composant important de la paroi bactérienne ; leur dénaturation peut nuire à l'affinité du médicament pour sa cible.³⁷ L'expression d'une nouvelle protéine résultant de l'altération de PLP, nommée PLP2a, a été démontrée dans les souches résistantes de *S. aureus*.^{38,39} La PLP2a montre une réduction de l'affinité pour les β -lactamines.⁴⁰

Du fait de la multirésistance, le SARM recourt également à une grande variété d'autres mécanismes non mentionnés dans ce document pour faire face à différentes classes d'antibiotiques.⁴¹

1.2 FACTEURS FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE

Les bactéries ont commencé à se doter de mécanismes de résistance bien avant l'avènement des traitements antibiotiques contre les maladies infectieuses.⁴² L'intervention humaine a toutefois introduit plusieurs facteurs qui, au fil du temps, ont contribué au phénomène de résistance antimicrobienne. L'utilisation massive des antibiotiques a profondément changé l'évolution et la propagation de la résistance en exerçant des pressions de sélection sur divers hôtes et environnements.⁴³

De façon générale, l'usage inapproprié et excessif des antibiotiques nuit à leur efficacité. Par exemple, la surutilisation encouragée par la vente libre⁴⁴, l'usage intensif et prolongé des antibiotiques dans les hôpitaux^{45,46}, les prescriptions inadéquates² ou encore l'administration de quantités sub-thérapeutiques chez les animaux d'élevage pour promouvoir leur croissance⁴⁷ sont des

facteurs qui contribuent à l'émergence des bactéries résistantes. L'environnement joue également un rôle clé pour leur propagation et leur transmission. Les agents antibactériens libérés dans la nature via les déchets humains, les déchets animaux ou les rejets de l'industrie pharmaceutique permettent, entre autres, d'enrichir le réservoir préexistant de résistance.⁴⁸ Le microbiome environnemental abrite, en effet, une vaste diversité de gènes de résistance pouvant être transmis entre espèces bactériennes.⁴⁹ La pollution de l'environnement aux antibiotiques favorise ces gènes par pression sélective.⁴³

1.3 IMPACTS DE LA RÉSISTANCE

La menace grandissante des bactéries pathogènes résistantes laisse place à des répercussions alarmantes au niveau mondial. L'utilisation des antibiotiques étant essentielle pour combattre les infections bactériennes, la perte possible de leur efficacité devient un enjeu majeur auquel est confrontée la médecine moderne.⁵⁰ De nombreuses procédures communes telles que le cathétérisme, l'intubation, la transplantation ou encore la chimiothérapie, qui dépendent du succès des agents anti-infectieux, deviennent d'autant plus risquées.⁵¹ Les taux de morbidité et de mortalité liés aux complications infectieuses subissent ainsi une augmentation due à la multirésistance des bactéries.⁵² Une étude collaborative publiée en 2022 dans le journal *The Lancet* a permis de tracer un portrait représentatif du fardeau qu'est la résistance antimicrobienne à l'échelle mondiale.⁵ Des 23 agents pathogènes analysés, seulement six sont responsables de la majorité des décès associés à la résistance : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*. En se basant sur les modèles de prédiction statistique de l'étude, elles auraient causé, en 2019, 3,57 millions (2,62–4,78) de morts associées à la résistance. Selon une estimation tirée du rapport *Review on Antimicrobial Resistance* (2016), l'antibiorésistance pourrait coûter la vie de 10 millions de personnes par année d'ici 2050 si aucune solution proactive n'est mise en pratique pour ralentir ce phénomène.⁵³ Dans ce contexte, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques devient fort pertinente pour lutter contre les bactéries pathogènes résistantes.

1.4 LES BALSACONES

1.4.1 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Parmi les nombreuses plantes médicinales retrouvées dans la forêt boréale, *Populus balsamifera* fait partie des espèces végétales les plus utilisées par les peuples autochtones du Canada.⁵⁴ Ses bourgeons entrent dans la composition de remèdes traditionnels pour soigner les blessures⁵⁵, une indication de leur activité potentielle contre les infections. L'étude phytochimique des bourgeons de *P. balsamifera* a permis d'identifier trois dihydrochalcones (DHCs) cinnamylées, les balsacones A, B et C (**1a-c**) (**Figure 2**), présentant une activité antibactérienne significative contre le *Staphylococcus aureus* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) respectives de 6,3, 6,3 et 3,1 μM .⁸

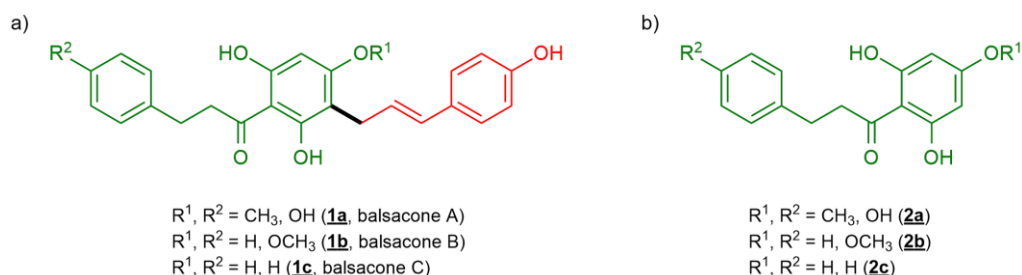


Figure 2. a) Structures des balsacones A, B et C (**1a-c**), le motif 4-hydroxycinnamique est mis en évidence en rouge ; b) structure des dihydrochalcones précurseurs (**2a-c**).

Les balsacones ont également démontré une activité antimicrobienne *in vitro* contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).⁹ Les travaux de Côté *et al.* (2019) ont permis de déterminer le mode d'action de la balsaconne C.¹⁰ Cette dernière agit en perturbant la membrane des bactéries qui, une fois endommagée, permet la libération des constituants intracellulaires menant à la mort de l'organisme. De plus, l'équipe a tenté d'induire la résistance à la balsaconne C chez le SARM en traitant les bactéries avec des doses sub-inhibitrices de l'agent antibactérien. Étonnamment, l'exposition répétée à la balsaconne C n'a pas semblé entraîner de résistance chez les souches traitées avec des IC_{50} allant de $3,0 \pm 0,3$ à $3,9 \pm 0,4$ mg/L après induction. Cette caractéristique rend la famille des balsacones particulièrement pertinente pour la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

En addition à leur activité antibactérienne, les balsacones présenteraient aussi un intérêt pour le traitement topique du psoriasis en raison de leurs propriétés antiprolifératives, anti-inflammatoires et antioxydantes.¹¹

Cependant, le rendement d'extraction de ces molécules est très faible, de l'ordre de la dizaine de milligrammes par kilogramme de matière végétale⁸, ce qui restreint les perspectives de développement de leur potentiel pourtant prometteur.

1.4.2 SYNTHÈSE TOTALE

Pour remédier au problème de rendement d'isolation, quelques chercheurs se sont tournés vers la synthèse totale des balsacones.

1.4.2.1 BALSACONE A

Une méthode a été décrite pour la production en neuf étapes d'un précurseur protégé de la balsacone A avec un rendement global de 10 %.¹² Le protocole permet notamment la synthèse de l'asébogénine (**2a**) à partir du phloroglucinol (**3**) commercial (**Schéma 1**). Le produit de départ est d'abord converti en 5-méthoxyrésorcinol (**4**) par méthylation, puis en un composé monoacylé (**5**), par acylation de Friedel-Crafts, en présence d'un acide de Lewis (AlCl_3), avec du chlorure d'acétyle dans le dichlorométhane. À cette étape, une proportion stœchiométrique d' AlCl_3 est employée, ce qui génère, après hydrolyse, une grande quantité d'eau usées.⁵⁶ Les positions hydroxyles de l'intermédiaire résultant sont protégées par des groupements benzyles (Bn) avec du bromure de benzyle dans le DMF pour former l'intermédiaire **6**. La séquence se poursuit par la réaction du composé **6** avec le 4-(méthoxyméthoxy)benzaldéhyde (**7**) pour conduire à la chalcone **8** par condensation de Claisen-Schmidt. La double liaison de la cétone α,β -insaturée est réduite par hydrogénation catalysée au Pd/C, retirant au passage les fonctions benzyles. Enfin, l'asébogénine est obtenue après le clivage en conditions acides du méthoxyméthyle (MOM), un groupement protecteur communément utilisé pour bloquer les fonctions hydroxyles d'une molécule.

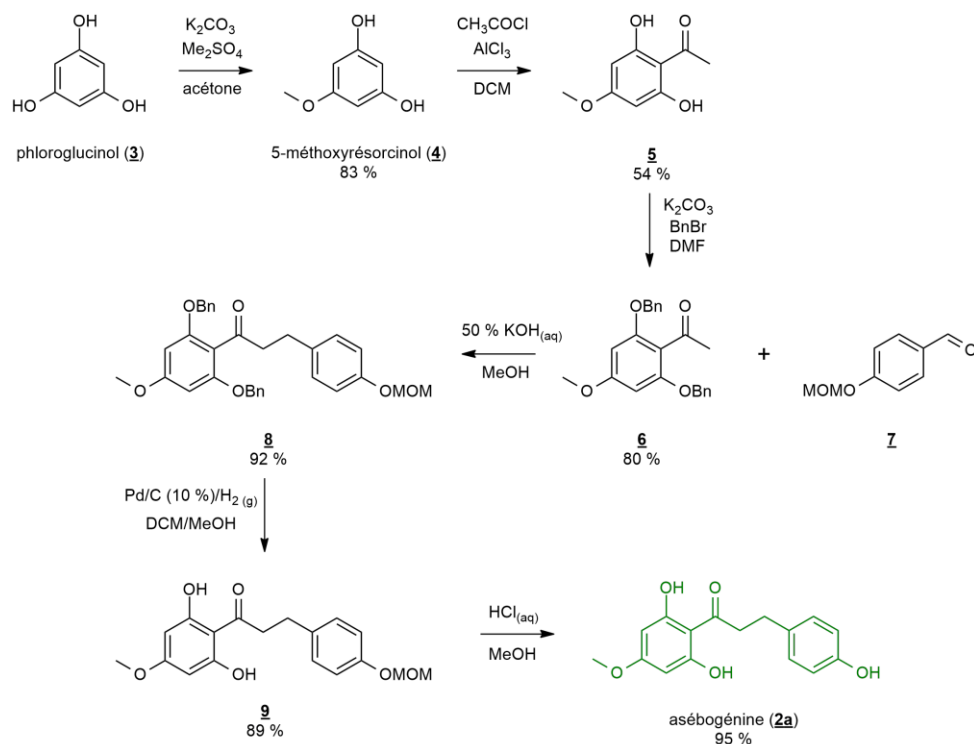


Schéma 1. Synthèse totale de l'asébogénine à partir de précurseurs simples.

En reprenant à l'intermédiaire **9**, une balsacone protégée (**15**) peut être produite en 4 étapes supplémentaires (**Schéma 2**). La O-alkylation d'un groupement phénolique par le bromure d'allyle en présence de K_2CO_3 permet la formation du composé majoritaire **11** via une synthèse de Williamson. La réaction en conditions basiques peut également engendrer une C-alkylation, d'où le sous-produit **10**. Le dérivé **12** est issu d'un réarrangement Claisen dans le chlorobenzène avec chauffage du milieu réactionnel clos. Pour poursuivre, les positions hydroxyles du composé **12** sont protégées par des groupements MOM avec une base, la diisopropyléthylamine (DIPEA), dans le dichlorométhane. La dernière transformation complétée est une métathèse entre le composé **13** et le 1-(méthoxyméthoxy)-4-vinylbenzène (**14**). Elle est activée par le catalyseur de Grubbs de deuxième génération.

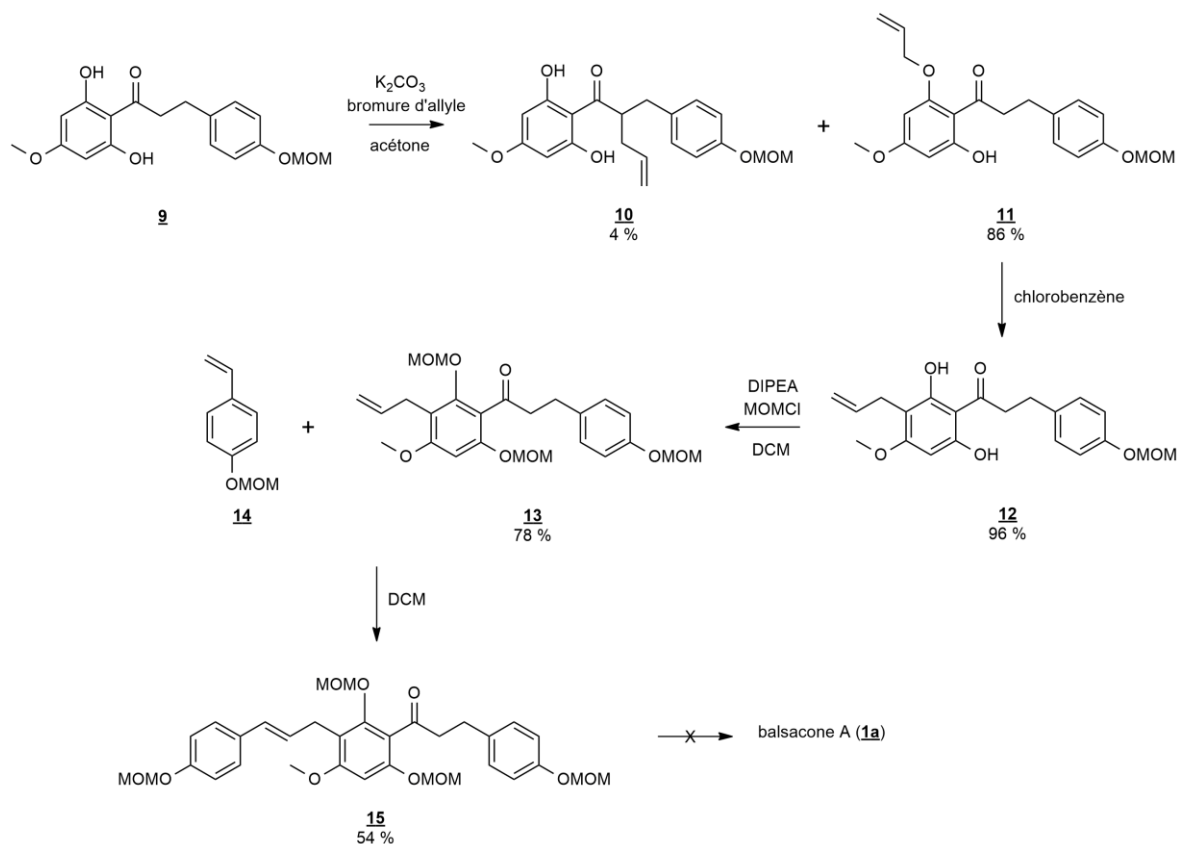


Schéma 2. Synthèse d'un précurseur protégé de la balsacone A.

Malheureusement, la déprotection des hydroxyles du dérivé **15** n'a pas été complétée. La méthode ne permet donc pas d'aboutir à la balsacone A (**1a**), bien que plusieurs tentatives aient été effectuées pour parvenir à retirer les groupements MOM de la molécule (HCl concentré dans le méthanol, HCl dilué, HCl dans le dioxane, NaHSO₄ supporté sur silice).

Cette stratégie de synthèse multi-étapes est complexe, fastidieuse, et implique plusieurs réactifs halogénés toxiques pour l'humain et pour l'environnement. Elle fait intervenir des groupements protecteurs difficiles à retirer, si bien que le produit final désiré n'a pas pu être synthétisé. L'emploi de tels groupements est d'ailleurs désavantageux en termes d'économie d'étapes et d'atomes.

1.4.2.2 BALSACONES B ET C

Un protocole détaillant la synthèse des balsacones B et C a été publié en 2017.¹³ La séquence de huit étapes débute par la préparation des dihydrochalcones correspondantes (**Schéma 3**). Dans un premier temps, la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (**16**) est protégée par le chlorométhoxyméthane (MOM-Cl). L'intermédiaire **17** résultant est condensé avec l'aldéhyde associé soit à la balsacone B (anisaldéhyde), soit à la balsacone C (benzaldéhyde) pour obtenir les chalcones **18a** et **18b**. Les groupements MOM sont par la suite déprotégés avec de l'acide chlorhydrique concentré dans le méthanol. Les DHCs précurseurs **2b** et **2c** sont produites par hydrogénation catalytique.

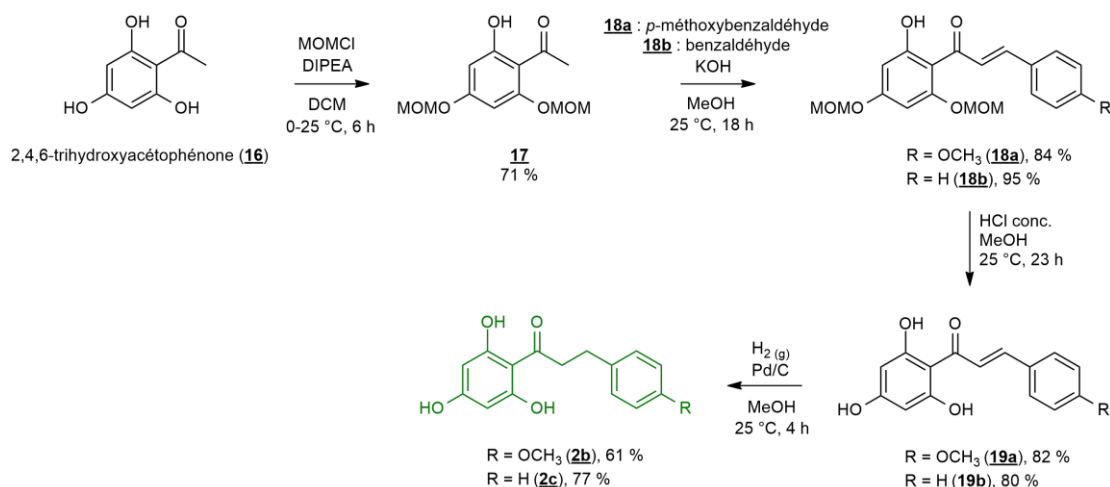


Schéma 3. Synthèse des dihydrochalcones précurseurs des balsacones B et C (**2b-c**) à partir de la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (**16**).¹³

Le **Schéma 4** illustre la formation du bromure d'allyle (**24**). L'acide 4-hydroxycinnamique (**20**) subit d'abord une estérification à reflux catalysée avec l'acide paratoluènesulfonique (APTS), puis est protégé pour mener au dérivé **22**. L'hydruure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) agit ensuite comme réducteur de l'ester en alcool cinnamique protégé (**23**). Le composé est finalement converti en bromure de cinnamyle (**24**) après un traitement au PBr₃ dans l'éther diéthylique.

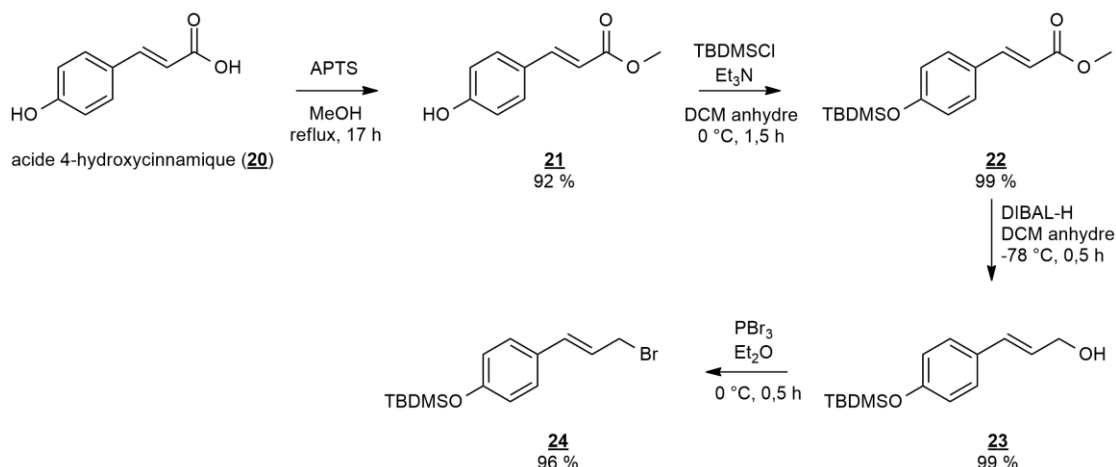


Schéma 4. Synthèse du bromure de cinnamyle protégé.

Les dérivés protégés de balsacons **25a-b** sont obtenus par alkylation de Friedel-Crafts des DHCs **2b-c** avec le bromure de cinnamyle (**24**) en présence de NaH dans le tétrahydrofurane (THF) (**Schéma 5**). Cette étape fait appel à un halogénure d'alkyle protégé relativement instable dont la synthèse implique un réactif d'halogénéation nocif. Pour finir, les groupements TBDMS sont retirés par le fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) et de l'acide trifluoroacétique, conduisant aux balsacons B (**1b**) et C (**1c**) avec des rendements respectifs de 50 % et 55 %.

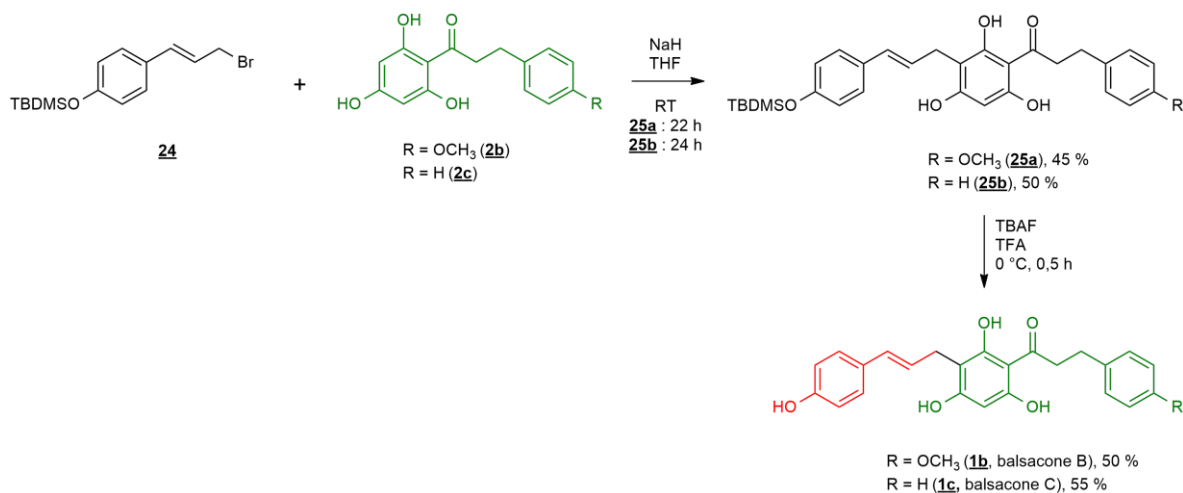


Schéma 5. Alkylation des dihydrochalcones trihydroxylées (**2b-c**) par le bromure de cinnamyle protégé (**24**) et déprotection des molécules (**25a** et **25b**) pour obtenir les balsacons B (**1b**) et C (**1c**).

La méthode développée comporte de nombreuses transformations faisant appel à des groupements protecteurs, des dérivés halogénés et certains réactifs nocifs.

1.4.3 HÉMISYNTHÈSE VERTE

Une nouvelle approche développée dans les laboratoires de l'UQAC permet de surmonter certaines limitations liées à l'isolation et à la synthèse totale des balsacons A, B et C. Elle repose sur le principe d'hémisynthèse, c'est-à-dire la formation de composés chimiques à partir de molécules complexes naturelles. La méthode mise au point par Alsarraf *et al.* (2020), qui allie l'extraction végétale à la synthèse chimique, permet de convertir des précurseurs biosourcés en balsacons en s'inspirant de leur biosynthèse.¹⁴ Elle consiste à assembler les dihydrochalcones naturelles (**2a-c**) avec l'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) par alkylation de Friedel-Crafts pour obtenir les balsacons (**1a-c**) en une seule étape catalytique, sans groupements protecteurs (**Schéma 6**). Contrairement à la synthèse multi-étapes où des réactifs simples issus de la pétrochimie sont utilisés, cette approche permet de former rapidement des molécules à haute valeur ajoutée tirant parti de la structure complexe et la diversité des composés naturels. Les balsacons A, B et C ont ainsi pu être produites avec des rendements de synthèse respectifs de 70, 51 et 56 %.

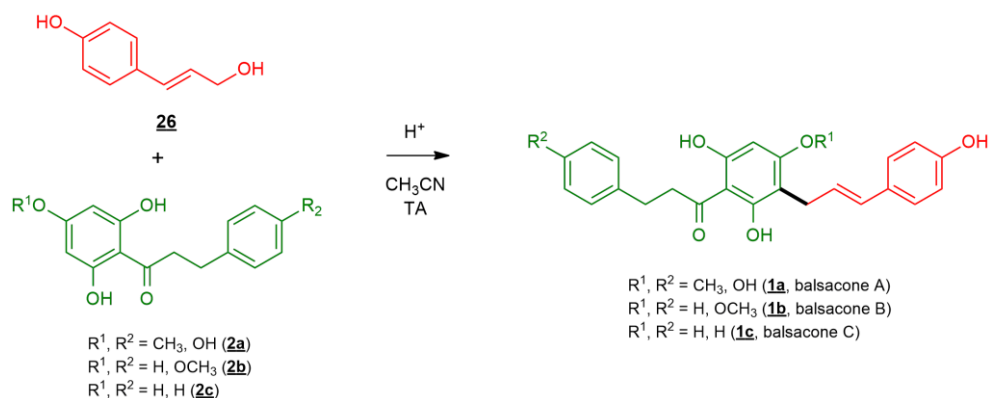


Schéma 6. Hémisynthèse de balsacons (**1a-c**) par alkylation de Friedel-Crafts de DHCs (**2a-c**) avec l'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**).

Le protocole d'alkylation répond à plusieurs des douze principes de la chimie verte.⁵⁷ L'utilisation de précurseurs renouvelables, la catalyse de la réaction, l'économie d'étapes de synthèse et de

ressources pour accéder au produit final et le contournement de réactifs halogénés nocifs communément retrouvés dans ce type de transformations¹⁶ permettent un procédé plus sécuritaire et respectueux de l'environnement. De plus, l'utilisation d'un alcool cinnamique à la place d'un halogénure d'alkyle permet de générer de l'eau comme seul sous-produit de la réaction. Toutefois, l'enjeu de cette approche globalement verte est la disponibilité des DHCs naturelles qui servent de précurseurs polyfonctionnels à l'hémisynthèse.

1.4.3.1 DISPONIBILITÉ DES PRÉCURSEURS

Une variété de dihydrochalcones est disponible chez les végétaux.⁵⁸ Les bourgeons du peuplier baumier renferment non seulement des balsacones antibactériennes, mais également les DHCs **2a-c**, en teneurs plus importantes. Le fractionnement de l'extrait des bourgeons de *P. balsamifera* permettrait d'obtenir une fraction enrichie en ces composés pour effectuer les transformations.

Par ailleurs, des travaux antérieurs montrent que l'asébotine (**27**) (**Figure 3**), un glycoside de DHC, est un composé retrouvé en abondance dans les parties aériennes de *K. angustifolia*.¹⁷

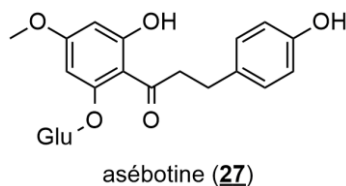


Figure 3. Structure de l'asébotine (**27**).

Le kalmia à feuilles étroites est une Éricacée qui prolifère dans la forêt boréale canadienne.¹⁸ Sa présence est toutefois considérée comme indésirable dans les sites ayant subi des perturbations telles que des coupes à blanc, des feux de faible intensité ou des épidémies.¹⁹ Dans le cas des forêts d'épinettes noires, la croissance excessive du kalmia nuit au reboisement post-incendie en rivalisant avec les jeunes arbres pour les nutriments et la lumière.²⁰ Cette plante représente également un enjeu en agriculture, notamment dans les bleuetières où le sol sablonneux et pauvre des cultures constitue un milieu propice à sa croissance.⁵⁹ Elle contribue ainsi à réduire le rendement en fruits des

récoltes en bleuetières. Conventionnellement, le problème d'abondance du kalmia à feuilles étroites peut être géré par l'emploi d'herbicides, lesquels peuvent s'avérer nuisibles pour l'environnement et pour la santé humaine.^{21,22} Dans certaines prises d'eaux potables avoisinant les bleuetières du Lac St-Jean, des traces d'herbicides utilisés pour limiter la croissance du kalmia dans ces cultures ont d'ailleurs été retrouvées.⁶⁰ Une manière alternative de contrôler sa prolifération en milieu agricole est en l'arrachant simplement, une solution coûteuse en temps et en énergie pour une biomasse qui n'apporte aucune valeur ajoutée. L'utilisation de *K. angustifolia* comme matière première renouvelable dans la production de balsacones permettrait ainsi de valoriser une plante indésirable et d'améliorer sa gestion dans des contextes forestier et agricole.

1.4.4 OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'urgence d'alimenter l'arsenal thérapeutique pour lutter contre la résistance aux antibiotiques confère une importance particulière à l'approfondissement de la recherche sur les balsacones. Dans ce contexte, les objectifs du présent projet (**Figure 4**) consistent à : i) optimiser l'extraction d'une dihydrochalcone abondante dans les parties aériennes de *K. angustifolia* pour produire de l'asébogénine précurseur de la balsacone A et ii) améliorer l'activité biologique de l'extrait du bourgeon de *Populus balsamifera* par l'hémisynthèse d'analogues de balsacones.

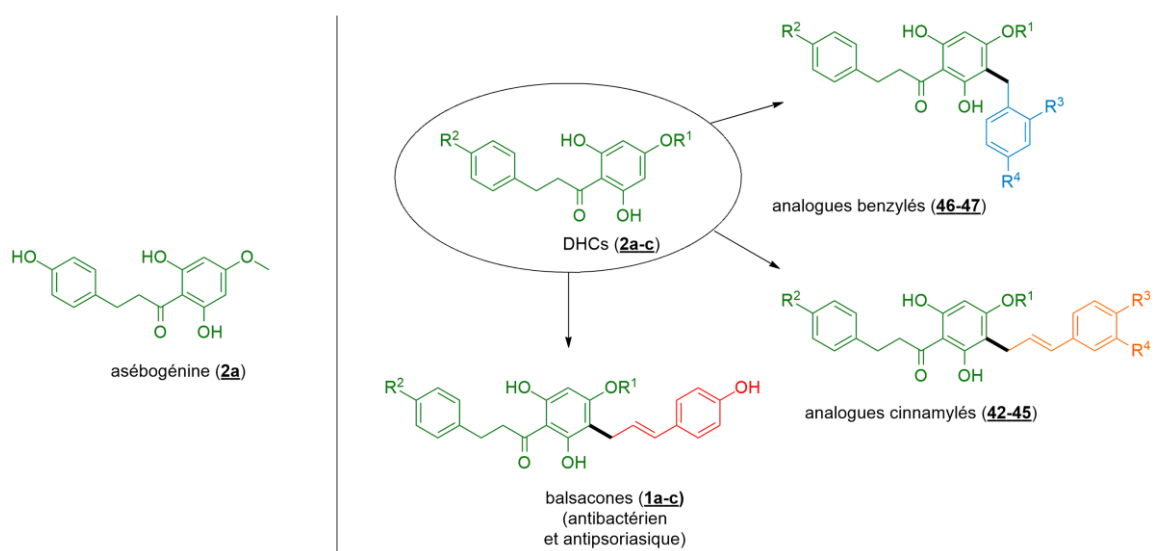


Figure 4. Schéma de principe du projet : production d'asébogénine (**2a**) et conversion de dihydrochalcones (**2a-c**) en différents dérivés aux propriétés variées.

CHAPITRE 2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 VOLET 1 : VALORISATION DES PARTIES AÉRIENNES DE *K. ANGUSTIFOLIA*

2.1.1 OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION

La méthode d'extraction¹⁷ a été optimisée pour extraire l'asébotine (**27**) des parties aériennes de *K. angustifolia*. Trois extractions à reflux consécutives de parties aériennes dans l'éthanol 95 % ont été réalisées. Avant d'être réunis, les trois extraits individuels ont été analysés par HPLC selon la méthode décrite au chapitre 3.2.1 pour déterminer si chacune des extractions est nécessaire pour récupérer l'asébotine. Une courbe d'étalonnage de 0,03 mg/mL à 0,5 mg/mL a été réalisée pour doser le composé **27** sur 32,9 g de matière végétale. Le **Tableau 2** regroupe les résultats du dosage qui démontrent que l'asébotine est récupérée en quantités significatives dans chacun des extraits. Dans les trois étapes successives, le rendement d'extraction décroît progressivement de 22,1 à 3,2 %. La teneur en asébotine décroît également de 5,8 à 4,0 % m/m dans l'extrait. Par conséquent, trois extractions ont été jugées nécessaires pour obtenir un maximum d'asébotine à transformer.

Tableau 2. Dosage de l'asébotine au cours de l'extraction des parties aériennes de *K. angustifolia* dans l'éthanol 95 % avec chauffage (reflux) et sans chauffage (ambient)

Extractions	Rendement d'extraction (%)	Teneur en d'asébotine (% m/m)
Reflux 1	22,1	5,8
Reflux 2	8,3	4,6
Reflux 3	3,2	4,0
Reflux total	33,6	5,3
Ambiant 1	5,7	3,9
Ambiant 2	6,3	3,4
Ambiant 3	6,2	3,8
Ambiant total	18,2	3,7

De plus, une extraction par agitation à température ambiante a été effectuée pour vérifier l'effet du chauffage à reflux sur la quantité d'asébotine extraite. Pour une même masse de parties aériennes, le pourcentage massique d'asébotine contenue dans l'extrait brut est de 5,3 % m/m avec chauffage et de 3,7 % m/m à température pièce. Le rendement d'extraction est aussi nettement supérieur à reflux avec une valeur de 33,6 % en comparaison à 18,2 % avec agitation seulement. Le chauffage est donc un paramètre dont il faut tenir compte pour augmenter le rendement d'extraction du composé **27**.

2.1.2 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE *K. ANGUSTIFOLIA*

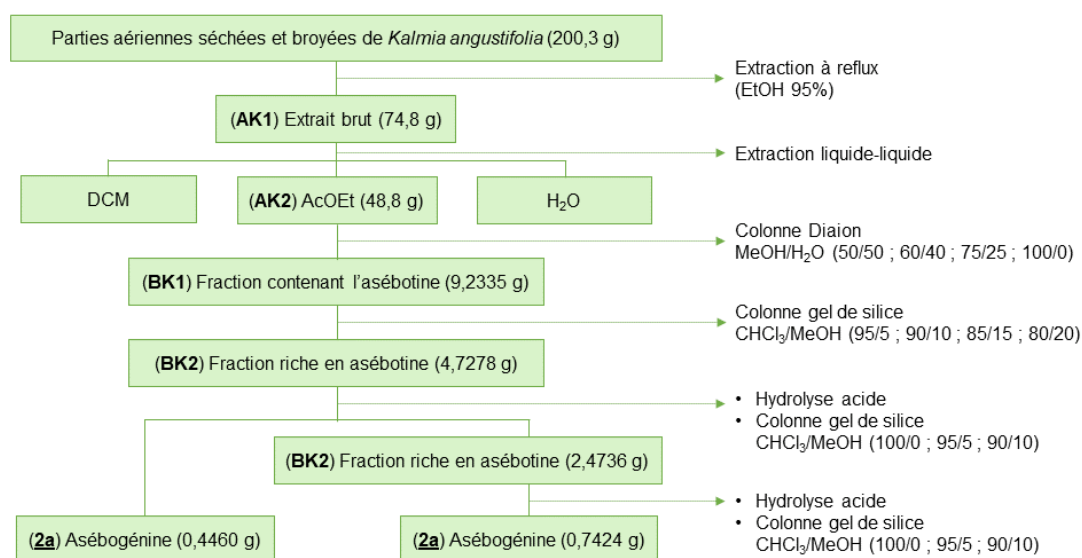


Figure 5. Schéma de production d'asébogénine (**2a**) à partir des parties aériennes de *K. angustifolia*.

Les conditions d'extraction au reflux décrites ci-dessus ont été appliquées avec 200,3 g de parties aériennes de plante. Elles ont permis d'obtenir 74,8 g d'extrait brut (**AK1**) pour un rendement d'extraction de 37 %. L'extrait brut a ensuite été trituré dans l'eau puis extrait successivement au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle. La phase extraite à l'acétate d'éthyle, contenant l'asébotine, constitue la fraction **AK2** (48,8 g). Les phases organiques apparaissent vert-brunâtre (dichlorométhane) et rouge-orangé (acétate d'éthyle), alors que la phase aqueuse est rouge-brun.

Une première séparation sur colonne de résine adsorbante Diaion™ a été réalisée, avec pour éluant un mélange MeOH/H₂O (50/50 ; 60/40 ; 75/25 ; 100/0). Cette étape a permis d'obtenir une fraction enrichie en asébotine (**BK1**) de 9,2335 g. Une seconde séparation sur colonne de gel de silice (CHCl₃/MeOH 95/5 ; 90/10 ; 85/15 ; 80/20) a conduit à la fraction **BK2**. Ces fractionnements ont été réalisés pour éliminer les impuretés apolaires visibles au-dessus de l'asébotine sur CCM (**Figure 6**). L'isolation complète de l'asébotine n'a pas été obligatoire pour sa conversion en asébogénine. En effet, l'asébotine, un hétéroside, est significativement plus polaire que l'asébogénine. La différence de polarité permet d'isoler facilement l'asébogénine sur colonne chromatographique après l'hydrolyse. Les composés moins polaires que l'asébotine sont donc retirés avant l'hydrolyse pour éviter une co-élution avec la génine. Le tout permet de contourner une étape supplémentaire d'isolation coûteuse en temps et en ressources.

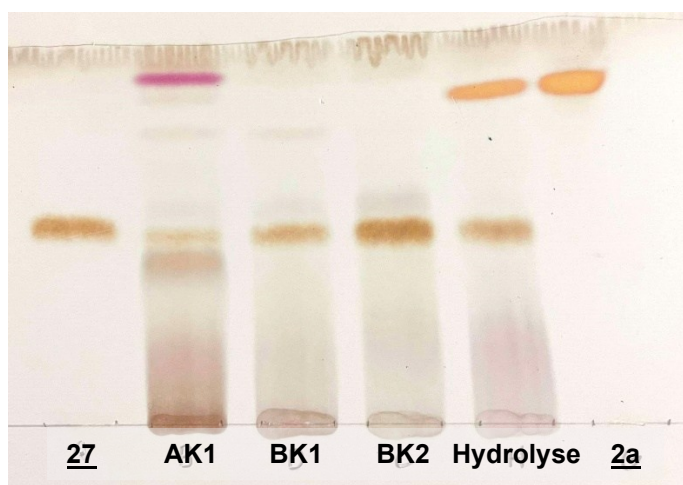


Figure 6. CCM (phase normale) des étapes de production de l'asébogénine (**2a**) à partir de l'extrait brut de *K. angustifolia* avec l'asébotine (**27**) comme référence. Milieu d'élution : CHCl₃/MeOH (9/1) ; révélation : H₂SO₄ (20 % dans MeOH), lumière visible.

2.1.3 HYDROLYSE DE L'ASÉBOTINE

Le clivage du lien glycosidique de l'asébotine a été réalisé par hydrolyse acide sur la fraction **BK2** pour former l'asébogénine (**2a**) (**Schéma 7**). La réaction est réalisée en présence de HCl dans l'eau à reflux.

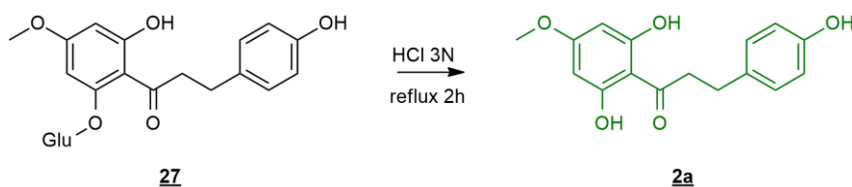


Schéma 7. Hydrolyse de l'asébotine (**27**) présente dans la fraction **BK2** en conditions acides.

La première réaction étant incomplète, une seconde hydrolyse a été effectuée pour convertir l'asébotine restante. Après chromatographie, un total de 1,1884 g d'asébogénine a été récupérée suivant la lyophilisation. La structure de l'asébogénine a été confirmée par spectroscopie RMN ^1H (**Annexe 1**). Conformément à la littérature⁸, les protons du cycle aromatique para-disubstitué ont été identifiés par les deux signaux caractéristiques à 7,06 et 6,71 ppm, intégrant chacun pour deux protons. Le singulet à 5,94 ppm, intégrant également pour deux protons, correspond aux deux protons aromatiques équivalents du cycle aromatique tétrasubstitué. Le groupement méthoxy porté par ce même cycle est identifié par le singulet à 3,79 ppm intégrant pour trois protons et les CH_2 par les triplets à 3,37 et 2,86 ppm. Le rendement global de la production d'asébogénine est de 0,6 % m/m à partir du matériel végétal sec. À titre de comparaison, l'isolation de l'asébogénine dans le bourgeon du peuplier baumier n'excède pas les 0,003 % de rendement.⁸ La méthode de production à partir de *K. angustifolia* peut donc être considérée comme plus performante. L'asébogénine ainsi obtenue pourra servir de précurseur renouvelable dans l'hémisynthèse verte de la balsacone A ou de nouveaux analogues.

2.2 VOLET 2 : MODIFICATION DE L'EXTRAIT DU BOURGEON DE *POPULUS BALSAMIFERA*

La deuxième approche envisagée pour moduler la structure des balsacones consiste à convertir des dihydrochalcones en analogues de balsacones directement dans un extrait riche en dihydrochalcones. Cette approche permettrait d'envisager une pharmacomodulation en faisant l'économie des étapes de fractionnement et d'isolation qui seraient nécessaires à l'obtention des précurseurs et des produits purs.

2.2.1 EXTRACTION DES BOURGEONS

Afin de moduler la structure des dihydrochalcones présentes dans les bourgeons de *Populus balsamifera*, un extrait riche en DHCs a été préparé. L'organigramme d'extraction des bourgeons et de fractionnement est présenté dans la **Figure 7**.

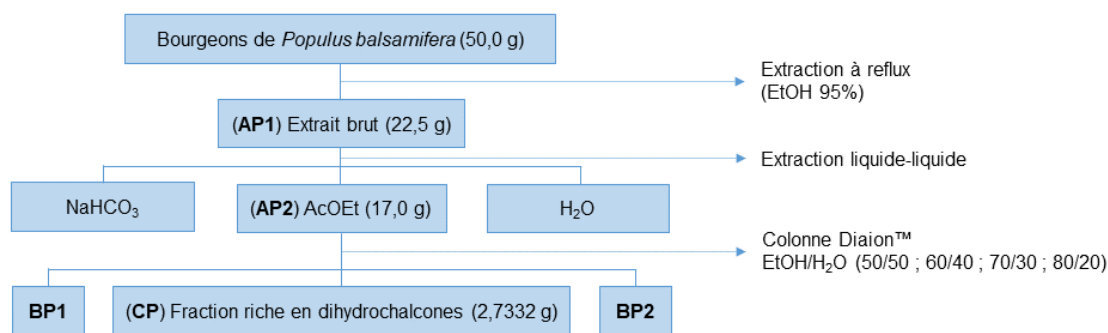


Figure 7. Schéma d'isolation d'un extrait riche en dihydrochalcones (**2a-c**) à partir des bourgeons de *Populus balsamifera*.

50,0 g de bourgeons ont été extraits trois fois à reflux dans l'éthanol 95 % pour conduire à l'extrait brut **AP1** avec un rendement de 45 %. L'extrait brut dissout dans l'acétate d'éthyle a été lavé avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ pour éliminer les acides organiques, puis à l'eau pour éliminer les traces de sel du premier lavage. L'extrait lavé (**AP2**) résultant a ensuite été fractionné sur colonne chromatographique.

2.2.2 OBTENTION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES

Le fractionnement sur colonne de résine adsorbante Diaion™ de l'extrait lavé a été réalisé en adaptant une méthode développée au laboratoire.⁶¹ Un mélange EtOH/H₂O de 50/50 à 80/20 a été utilisé comme éluant. Les DHCs ont été récoltées avec un ratio de 60/40. Une fraction (**BP1**) aux proportions quasi-équivalentes en balsacones (**1a-c**) et en DHCs (**2a-c**) ainsi qu'une fraction riche en balsacones (**BP2**) ont été obtenues après cette première séparation. Un nouveau fractionnement de la fraction **BP1** a permis d'obtenir 2,7332 g de fraction riche en DHCs (**CP**). La **Figure 8** montre un agrandissement des chromatogrammes obtenus par LC-MS (UV 265,4 nm) de ces fractions et de

l'extrait lavé (**AP2**). Elle illustre entre autres l'augmentation de la concentration en balsacones ou en dihydrochalcones des fractions **BP2** et **CP** après le fractionnement de l'extrait lavé et de la fraction **BP1**.

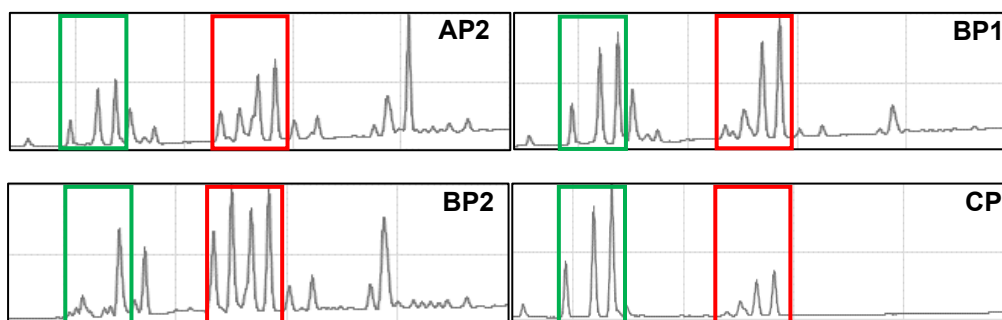


Figure 8. Chromatogrammes du fractionnement de l'extrait lavé ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**).

La fraction **CP** a été utilisée telle quelle pour les alkylations. En effet, il a été démontré que l'activité biologique de l'extrait du bourgeon de *P. balsamifera* pouvait être améliorée en convertissant les dihydrochalcones en balsacones directement dans l'extrait (résultats non publiés). La nature des composés formés dans l'extrait peut être confirmée par différentes techniques spectroscopiques et chromatographiques (spectroscopie de masse, HPLC, CCM).

2.2.3 SYNTHÈSE DES ALCOOLS

Cinq alcools cinnamiques (**26** ; **28-31**) et deux alcools benzyliques (**32-33**) (**Figure 9**) ont été utilisés pour modifier la fraction riche en dihydrochalcones. Parmi eux, l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (**28**) et l'alcool 4-méthoxycinnamique (**29**) ont été synthétisés à partir de leur ester (**34**) ou leur acide (**35**) correspondant (**Schéma 8**) ; les autres (**26**, **30-33**) étaient disponibles au laboratoire. La structure des alcools a été confirmée par spectroscopie RMN ¹H.

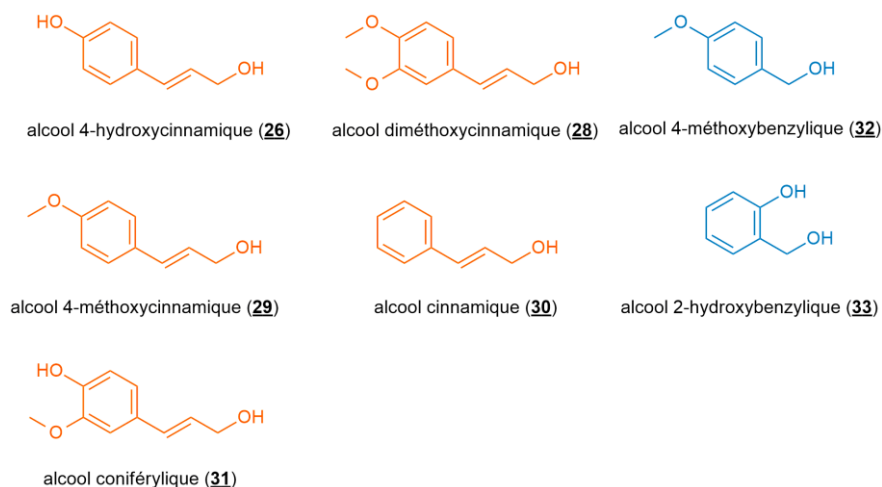


Figure 9. Alcools cinnamiques (**26** ; **28-31**) et benzyliques (**32-33**) utilisés pour la modification de la fraction riche en dihydrochalcones (**CP**).

Le composé **28** a été formé en faisant réagir l'ester **34** avec un agent réducteur, l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) en solution à 1 mol/L dans le toluène anhydre pendant 1 h à 0 °C pour un rendement de 72 %. Le groupement CH₂ au pied de l'alcool peut être identifié par le triplet à 4,35 ppm (**Annexe 2**).

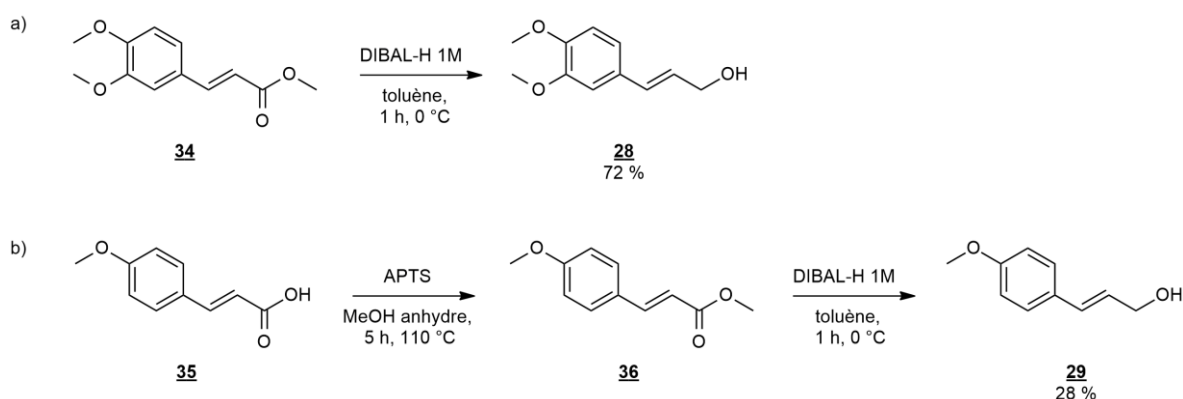


Schéma 8. Synthèse des alcools ; a) 3,4-diméthoxycinnamique (**28**) et b) 4-méthoxycinnamique (**29**).

L'alcool 4-méthoxycinnamique a été préparé en deux étapes : une estérification suivie d'une réduction⁶². La première étape de synthèse a été réalisée sous atmosphère inerte à reflux dans le méthanol en présence d'acide paratoluènesulfonique (APTS) pour conduire au composé **36**. L'ester a ensuite réagi avec le DIBAL-H 1 M en solution dans le toluène anhydre pendant 1 h à 0 °C pour

former l'alcool **29** avec un rendement de 28 %. L'identification du triplet à 4,34 ppm intégrant pour deux protons permet de valider la formation de l'alcool 4-méthoxycinnamique (**Annexe 3**).

2.2.4 HÉMISYNTHÈSE DE BALSACONES

La stratégie d'hémisynthèse de balsacones antibactériennes consiste à combiner les dihydrochalcones par alkylation de Friedel-Crafts avec l'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) en présence d'un catalyseur acide de Brønsted, l'acide paratoluènesulfonique. La méthode¹⁴ décrite emploie l'acétonitrile anhydre comme solvant en conditions inertes afin d'éviter la présence d'eau dans le milieu. Des essais préliminaires ont toutefois montré qu'il n'est pas indispensable d'employer un solvant anhydre. Il a été démontré que l'acétate d'éthyle pouvait servir de substituant sans nuire de manière trop importante à la réaction, le rendement variant de 55 % à 70 % pour la synthèse de la balsacone A (**1a**).¹⁴ Il s'agit également d'un solvant plus sécuritaire que l'acétonitrile.⁶³ L'utilisation d'APTS supporté par un polymère permet de contourner l'extraction liquide-liquide visant à éliminer l'APTS dissout puisqu'il suffit de filtrer le mélange brut réactionnel pour récupérer les billes de catalyseur. Brièvement, la fraction riche en DHCs (**CP**) a été traitée avec l'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) en présence d'APTS supporté dans l'acétate d'éthyle à température ambiante pendant 18 h (**Schéma 9**).

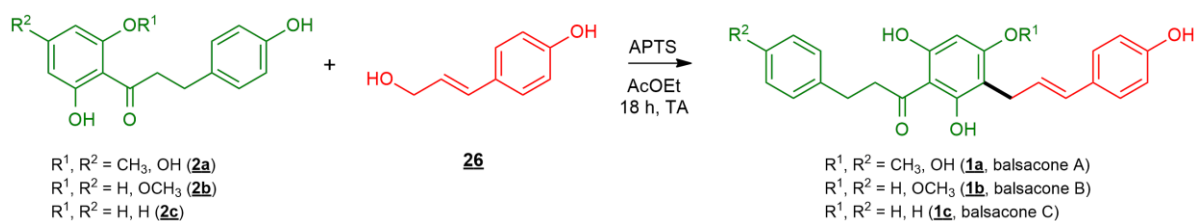


Schéma 9. Hémisynthèse de balsacones (**1a-c**) par alkylation de Friedel-Crafts.

Le suivi de la réaction a été fait par chromatographie sur couche mince pour vérifier que l'alcool, en défaut par rapport aux dihydrochalcones, a été entièrement consommé. L'enrichissement en balsacones de la fraction riche en DHCs a été confirmée par HPLC selon la méthode présentée à la

section 3.2.2 et se manifeste sur les chromatogrammes par une diminution des signaux correspondant aux DHCs, ainsi qu'une augmentation des signaux correspondant aux balsacons (**Figure 10**). Les temps de rétention et la spectrométrie de masse ont permis de vérifier l'identité des différents composés.

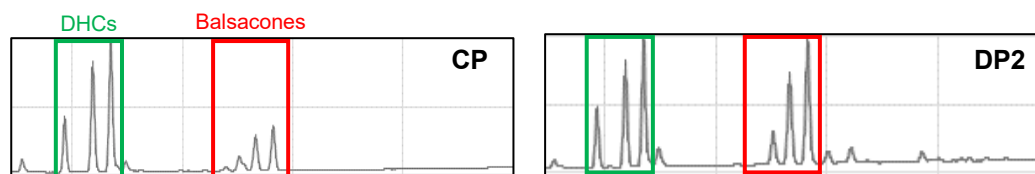


Figure 10. Chromatogrammes de la fraction riche en DHCs (**CP**) et de la fraction enrichie en balsacons avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP2**) ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacons (**1a-c**).

Le mécanisme de l'hémisynthèse des balsacons est présenté au **Schéma 10**. L'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) est protoné par l'acide pour former un meilleur groupement partant, l'eau, qui est d'ailleurs le seul sous-produit de la réaction. Un carbocation (**38**) résulte de la déshydratation du composé **37**. Les dihydrochalcones (**2a-c**) réagissent ensuite avec le carbocation pour former un intermédiaire de Wheland (**39**). La réaromatisation du cycle mène aux balsacons (**1a-c**) et régénère l'acide.

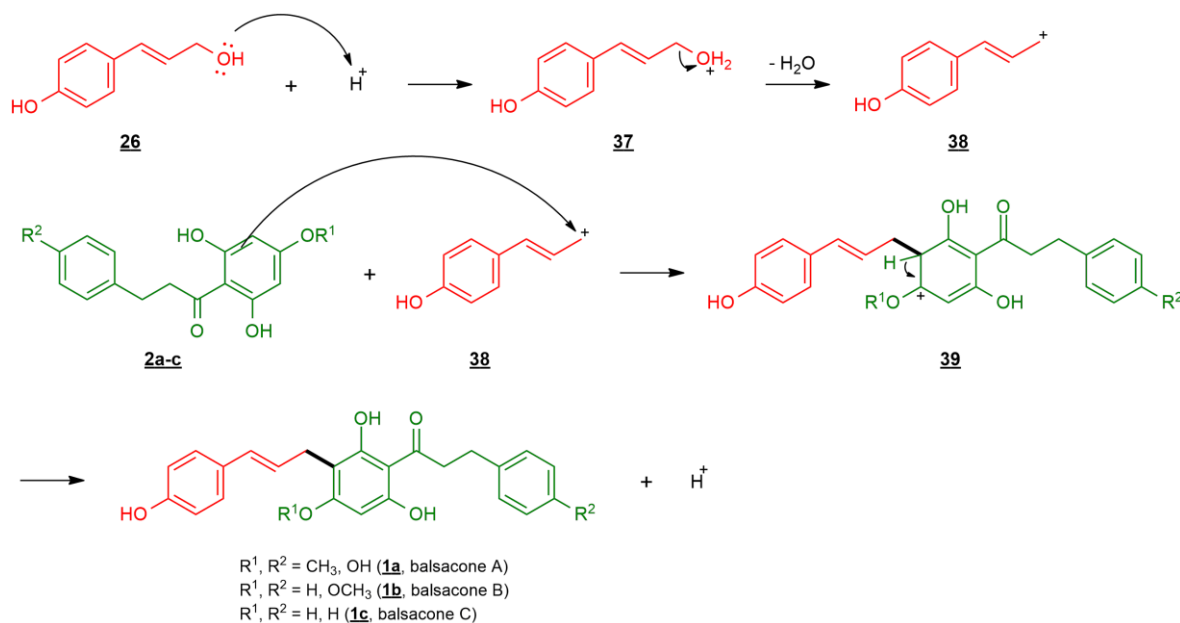


Schéma 10. Mécanisme réactionnel d'hémisynthèse de balsacons antibactériennes.

L'optimisation de la production des balsacones A, B et C dans l'extrait a été réalisée en faisant réagir la fraction **CP** avec différents pourcentages d'alcool 4-hydroxycinnamique. Les extraits modifiés obtenus (**DP1**, **DP2** et **DP3**) ont été analysés par HPLC afin de mesurer la consommation des DHCs et la formation des balsacones (**Figure 11**).

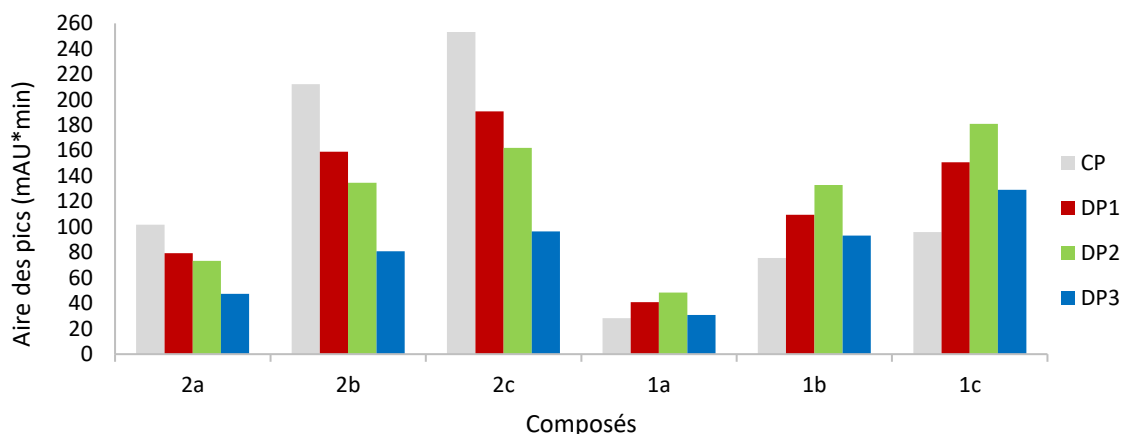


Figure 11. Optimisation de la production des balsacones **1a-c** à partir de la fraction riche en DHCs (**CP**) modifiée avec différents pourcentages d'alcool 4-hydroxycinnamique; 10 % m/m (**DP1**), 20 % m/m (**DP2**) et 30 % m/m (**DP3**).

À 10 % m/m (**DP1**), les signaux des DHCs subissent une forte diminution par rapport à la fraction **CP** et une augmentation de la quantité de balsacones est observée. À 20 % m/m (**DP2**), le niveau de DHCs continue de diminuer pour être converties en un maximum de balsacones. À 30 % m/m (**DP3**), les signaux des DHCs diminuent, mais ceux des balsacones également. Cela peut être dû à la formation de produits de double alkylation. En effet, l'augmentation de la proportion d'alcool 4-hydroxycinnamique peut conduire à une cascade de double alkylation-cyclisation qui permettrait la formation de balsacones plus complexes. Le **Schéma 11** illustre le mécanisme de la formation de la balsacone K (**41**) à partir de la balsacone A (**1a**). Un carbocation (**38**) issu de l'alcool 4-hydroxycinnamique peut réagir avec la balsacone A pour conduire à un nouveau carbocation (**40**). Ce dernier est piégé par la fonction hydroxyle adjacente pour former la balsacone K.

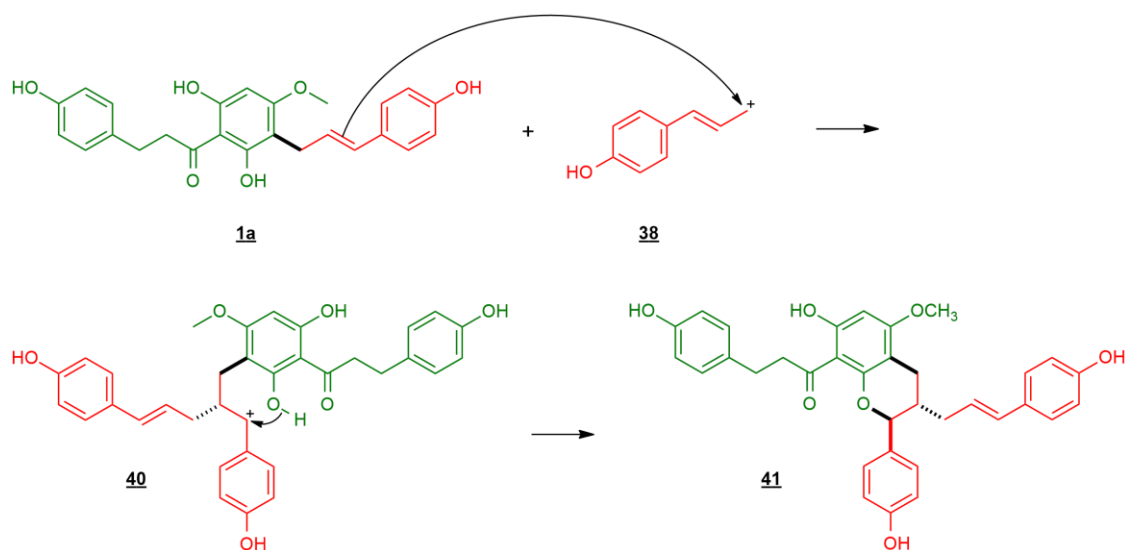


Schéma 11. Mécanisme réactionnel de la formation de la balsacone K (**41**).

Ainsi, les conditions optimales pour l'enrichissement en balsacones sont obtenues en employant 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique.

2.2.5 PHARMACOMODULATION DANS L'EXTRAIT

Après cette preuve de concept, différents électrophiles ont été utilisés pour effectuer la pharmacomodulation des balsacones. Quatre alcools cinnamiques (**28-31**) et deux alcools benzyliques (**32-33**) ont permis de former six fractions modifiées à partir de la fraction **CP**. D'une part, la structure des alcools cinnamiques apparentée à l'alcool 4-hydroxycinnamique fait d'eux de bons candidats pour moduler la fraction riche en dihydrochalcones. D'autre part, il existe, dans la nature, certaines classes de DHCs alkylées qui portent un motif benzylique telles que les uvarétines, des molécules efficaces contre les bactéries à Gram-négatif.⁶⁴ Les alcools benzyliques ont donc été sélectionnés pour leur potentiel à mener à de nouveaux dérivés d'intérêt.

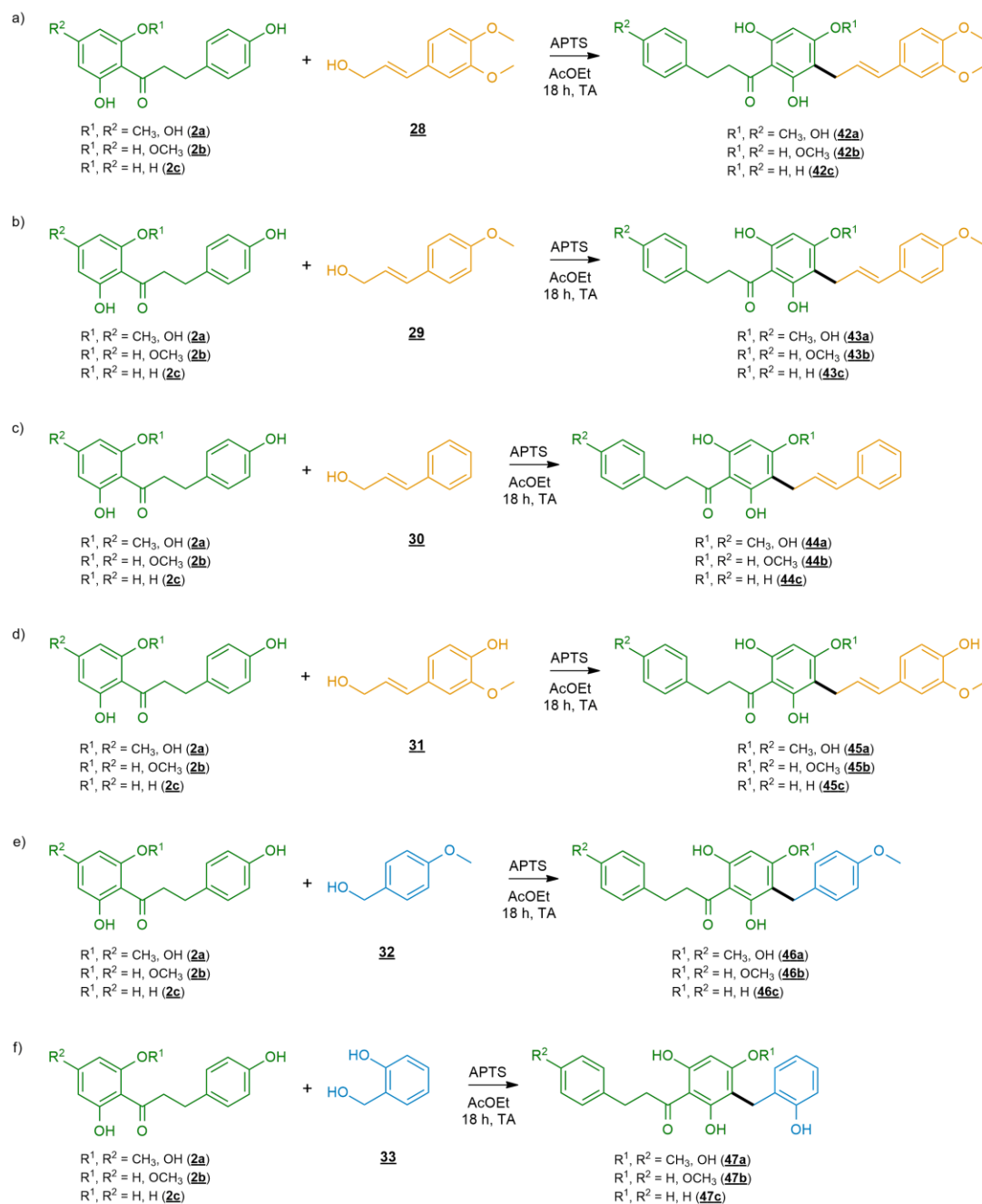


Schéma 12. Modification de la fraction riche en DHCs (**CP**) avec différents alcools cinnamiques (**28-31**) et benzylques (**32-33**). a) fraction **EP** ; b) fraction **FP** ; c) fraction **GP** ; d) fraction **HP** ; e) fraction **IP** ; f) fraction **JP**.

Les cinnamylations et les benzylations de la fraction **CP** ont été réalisées en suivant la stratégie d'hémisynthèse décrite ci-dessus (**Schéma 12**). Les transformations se sont déroulées à température ambiante en maintenant l'agitation pendant 18 h en présence d'APTS supporté. Les proportions

d'alcool engagées équivalent à 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique, soit le pourcentage optimal pour la production des balsacones A, B et C. Les alcools 3,4-diméthoxycinnamique (**28**) et 4-méthoxycinnamique (**29**) ont permis d'obtenir les fractions modifiées **EP** et **FP**. Les fractions **GP**, **HP**, **IP** et **JP** ont été produites en faisant réagir les alcools cinnamique (**30**), coniférylique (**31**), 4-méthoxybenzylique (**32**) et 2-hydroxybenzylique (**33**) avec la fraction riche en DHCs (**CP**).

Après chacune des réactions, la formation des analogues de balsacones a été vérifiée par LC-MS. Par exemple, dans le cas de la modification réalisée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (**32**), la formation d'analogues de balsacones est confirmée par l'apparition de trois nouveaux signaux sur le chromatogramme (21,0, 21,9 et 22,7 min) (**Figure 12**). La structure hypothétique de ces analogues est conforme avec les rapports m/z mesurés pour ces signaux (407,6, 407,6 et 377,6) qui correspondent à la masse des produits d'alkylation de Friedel-Crafts des dihydrochalcones.



Figure 12. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (**IP**). Les rapports m/z des analogues formés (**46a-c**) sont indiqués au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues.

Les échantillons ont été analysés en triplicata ; les aires moyennes des pics sont présentées sous forme de graphique à la **Figure 13**. L'identification des molécules a été effectuée à l'aide des spectres de masse. Les composés **1c**, **45a** et **45b** (fraction **HP**), ainsi que **47a** et **47b** (fraction **JP**) ont co-élué, empêchant une bonne différenciation des pics.

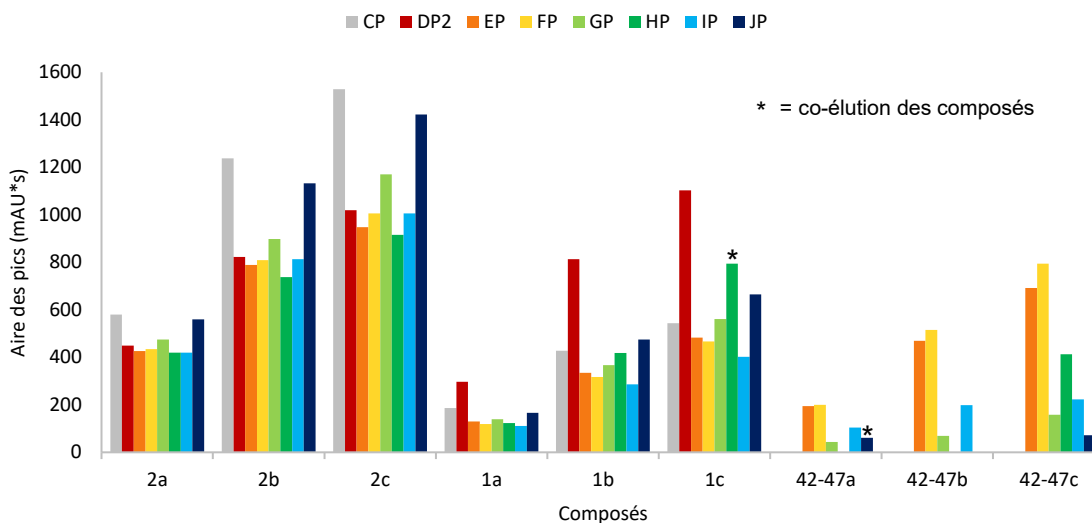


Figure 13. Formation d'analogues de balsacons (42-47a ; 42-47b ; 42-47c) à partir de la fraction riche en DHCs (**CP**). **DP2** = fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique; **EP** = fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique; **FP** = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique; **GP** = fraction modifiée avec l'alcool cinnamique; **HP** = fraction modifiée avec l'alcool coniférylique; **IP** = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique; **JP** = fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique.

De manière générale, pour les fractions modifiées (**EP-JP**), on observe une diminution des concentrations de dihydrochalcones (2a-c) par rapport à la fraction de départ (**CP**) et l'apparition des signaux correspondant aux produits d'alkylation de Friedel-Crafts attendus (42-47a-c). Cela permet de démontrer que la formation des nouveaux analogues est vraisemblablement due à la réaction des DHCs avec les différents alcools (28-33). La consommation des DHCs est généralement similaire d'une fraction modifiée à l'autre. La fraction **JP** a cependant un taux de conversion des DHCs nettement inférieur et la quantité de produits formés (47a-c) est également très faible. Il est donc probable que la réaction réalisée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique (33) soit moins efficace que les autres alkylations décrites.

Une légère diminution des signaux des balsacons (1a-c) a aussi été observée pour la plupart des fractions modifiées en comparaison à la fraction **CP**. Cette diminution pourrait être causée par des réactions secondaires dans lesquelles les balsacons réagiraient avec les alcools. Le phénomène de double alkylation-cyclisation, décrit précédemment, qui permet notamment de produire la balsacone K (41), en est un exemple. Les masses des composés potentiellement formés par la consommation des balsacons A, B et C n'ont toutefois pas été observées sur les chromatogrammes.

2.2.6 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

En collaboration avec l'équipe de biologie du laboratoire LASEVE, les fractions mères et modifiées ont été soumises à des tests biologiques. L'activité antibactérienne a été évaluée sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Deux expériences indépendantes ont été conduites pour *S. aureus* afin d'assurer la reproductibilité et chacun des essais a été reproduit en triplicata. Les cultures bactériennes ont été traitées avec des concentrations croissantes des différentes fractions.⁶⁵ Les résultats présentés au **Tableau 3** sont exprimés par la concentration minimale qui inhibe de 90 % la croissance bactérienne (CMI₉₀). La gentamicine a été utilisée comme contrôle positif dans ces tests.

Tableau 3. Activité antibactérienne des fractions mères (**AP2** = extrait lavé; **CP** = fraction riche en dihydrochalcones) et modifiées (**DP2** = fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique; **EP** = fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique; **FP** = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique; **GP** = fraction modifiée avec l'alcool cinnamique; **HP** = fraction modifiée avec l'alcool coniférylique; **IP** = fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique; **JP** = fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique)

Fractions	CMI ₉₀ (µg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b
AP2	>100	7,48 ± 0,07	9 ± 2
CP	100 ± 9	7,3 ± 0,2	9,0 ± 0,9
DP2	>100	7,4 ± 0,1	6,8 ± 0,5
EP	>100	5,4 ± 0,4	10 ± 1
FP	>100	6,9 ± 0,3	5 ± 1
GP	140 ± 4 ^c	8 ± 12	7,3 ± 0,1
HP	>100	7,2 ± 0,1	7,2 ± 0,08
IP	>100	4,0 ± 0,7	3,8 ± 0,1
JP	155 ± 14 ^c	7,4 ± 0,1	6,4 ± 0,1
Gentamicine ^d	0,024 ± 0,001	0,011 ± 0,005	0,017 ± 0,002

^a Expérience 1

^b Expérience 2

^c Valeur extrapolée

^d Contrôle positif

Aucune activité pertinente n'a été observée contre *E. coli*. Ce constat est conforme avec le fait que les balsacones sont inactives contre cette bactérie. Les fractions avant et après enrichissement semblent présenter une activité similaire contre *S. aureus*. Pourtant, il a été démontré que les DHCs (**2a-c**) sont inactives vis-à-vis cette souche.⁸ Sachant que tous les échantillons contiennent des balsacones à des concentrations différentes, on déduit que l'activité antibactérienne sur *S. aureus* ne varie pas de façon linéaire avec la quantité relative de balsacones.

De leur côté, les fractions contenant des analogues de balsacones (**EP-JP**) sont toutes actives contre *S. aureus*. L'activité est généralement assez similaire d'une fraction modifiée à l'autre, incluant **DP2**. Cependant, la modification d'extrait avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (**32**) a permis d'obtenir une fraction (**IP**) qui, pour les deux expériences sur *S. aureus*, semble indiquer une activité antibactérienne supérieure, soit $4,0 \pm 0,7$ µg/mL pour le premier essai et $3,8 \pm 0,1$ µg/mL pour le second. La pharmacomodulation pourrait ainsi permettre d'identifier des analogues (**46a-c**) plus actifs dans le mélange que les balsacones (**1a-c**).

L'activité cytotoxique des fractions contre des fibroblastes humains normaux (WS-1) a également été évaluée. Les concentrations qui inhibent de 50 % leur croissance (IC_{50}) sont rapportées dans le **Tableau 4**. De façon générale, les fractions modifiées ne sont pas cytotoxiques aux concentrations actives contre *S. aureus*. En effet, la CMI_{90} enregistrée la plus élevée est de 10 ± 1 µg/mL (**EP**, expérience 2) alors que la cytotoxicité des échantillons est constatée à partir de 31 ± 5 µg/mL (**DP2**). Par ailleurs, l'hémisynthèse semble diminuer la cytotoxicité de la fraction **CP**.

Tableau 4. Cytotoxicité des fractions mères (**AP2**, **CP**) et modifiées (**DP2** ; **EP-JP**) sur les fibroblastes humains (WS-1)

Fractions	IC ₅₀ (µg/mL)
AP2	40 ± 4
CP	6,0 ± 0,9
DP2	31 ± 5
EP	51 ± 5
FP	54 ± 9
GP	39 ± 6
HP	56 ± 7
IP	49 ± 7
JP	34 ± 7
Daunorubicine^a	<0,039 µM

^a Contrôle positif

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 GÉNÉRALITÉS

À moins d'indication contraire, tous les réactifs et les solvants ont été achetés auprès de sources commerciales et utilisés tels que reçus sans purification supplémentaire. Les réactions en conditions inertes ont été menées sous atmosphère d'argon avec des solvants anhydres. Le suivi des réactions a été réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254 en phase normale. Les plaques ont été visualisées à la lumière ultraviolette (UV) à 254 nm et révélées au H₂SO₄ (20 % dans le méthanol).

3.2 MÉTHODES D'ANALYSES INSTRUMENTALES

3.2.1 HPLC ANALYTIQUE

La chromatographie liquide haute performance a été utilisée pour doser l'asébotine (**27**) dans l'extrait des parties aériennes de *K. angustifolia*. Les échantillons préalablement filtrés sur membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE, 25 mm, 45 µm) ont été injectés à 1 µL sur une colonne ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) à 25,0 °C dans un chromatographe Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 muni d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). La séparation des composés a été réalisée avec un débit de 1 mL/min en utilisant un mélange CH₃CN/H₂O (**Tableau 5**). Les longueurs d'ondes d'analyse sont de 210 nm, 254 nm, 320 nm et 365 nm avec une bande passante de 2 nm.

Tableau 5. Gradient d'élution de la méthode HPLC analytique

Temps (min)	CH ₃ CN/H ₂ O
0	10/90
30	50/50
32	100/0
37	100/0
42	10/90
47	10/90

3.2.2 LC-MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour vérifier la conversion et la formation des composés dans l'extrait de bourgeon de *P. balsamifera*. Les échantillons préalablement filtrés sur membrane en PTFE (25 mm, 45 µm) ont été injectés à 5 µL sur une colonne ZORBAX Eclipse C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) à 25,0 °C. Les analyses ont été effectuées avec un chromatographe Agilent 1260 Infinity II muni d'un détecteur UV-visible et d'un spectromètre de masse avec ionisation par électrospray négative (LC/MSD Series Infinity lab). Les analyses ont été effectuées en électrospray négative. L'élution des composés a été réalisée avec un débit de 1 mL/min en utilisant un mélange MeOH/H₂O (**Tableau 6**). Les longueurs d'ondes d'analyse sont de 265 nm, 254 nm et 280 nm avec une bande passante de 4 nm.

Tableau 6. Gradient d'élution de la méthode LC-MS

Temps (min)	MeOH/H ₂ O
0	60/40
40	100/0
46	100/0
50	60/40

3.2.3 RMN

Les composés isolés ont été caractérisés par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire. Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Ascend 500 à 500 MHz avec comme solvant du chloroforme deutéré (CDCl_3) ou du méthanol deutéré (CD_3OD). Les déplacements chimiques (δ) ont été rapportés en parties par million (ppm) par rapport au pic résiduel de solvant (CDCl_3 , δ H 7,26 ppm; CD_3OD , δ H 3,34 ppm).⁶⁶ Les constantes de couplage (J) ont été rapportées en Hertz (Hz) et les multiplicités en utilisant les abréviations suivantes : s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; m = multiplet.

3.3 VOLET 1 : PRODUCTION D'ASÉBOGÉNINE À PARTIR DE *K. ANGUSTIFOLIA*

3.3.1 DOSAGE DE L'ASÉBOTINE DANS LES PARTIES AÉRIENNES DE *K.*

ANGUSTIFOLIA

L'asébotine a été quantifiée au cours de l'extraction des parties aériennes de *K. angustifolia*. Le matériel végétal a été récolté à l'automne 2021 dans la réserve faunique des Laurentides, au kilomètre 190 (200 mètres au sud de la route), et a été congelé immédiatement après. Une quantité de 32,9 g des parties aériennes de *K. angustifolia* préalablement séchées et broyées a été extraite à reflux dans l'éthanol 95 % durant trois périodes consécutives de 1,5 h pour obtenir trois extraits avec des masses respectives de 7,27 g, 2,72 g et 1,05 g. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des standards avec des concentrations d'asébotine de 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,250 et 0,500 mg/mL (**Figure 14**). Les standards ont été préparés dans des fioles jaugées de 25 mL, en diluant la quantité calculée d'asébotine dans du méthanol de grade HPLC pour atteindre les concentrations désirées. L'asébotine ($t_R = 16,8$ min) a été quantifiée dans les trois extraits individuels par HPLC selon la méthode décrite au chapitre 3.2.1.

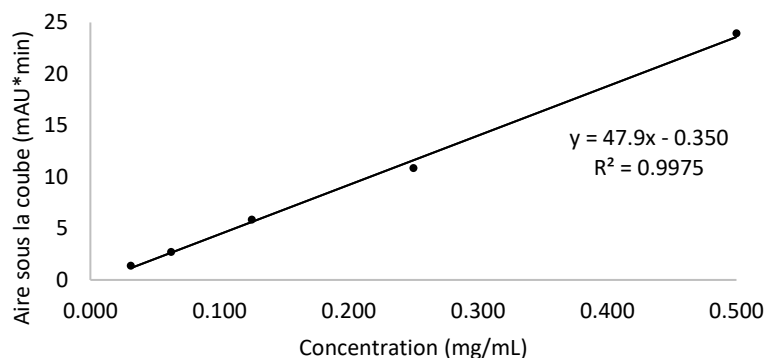


Figure 14. Courbe d'étalonnage du dosage de l'asébotine dans l'extrait brut des parties aériennes de *K. angustifolia*.

3.3.2 EXTRACTION DES PARTIES AÉRIENNES

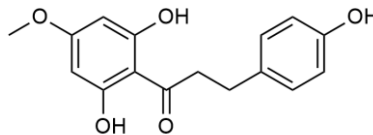
Le matériel végétal a été récolté à l'automne 2021 dans la réserve faunique des Laurentides, au kilomètre 190 (200 mètres au sud de la route), et a été congelé immédiatement après. Une quantité de 200,3 g des parties aériennes de *K. angustifolia* préalablement séchées et broyées a été extraite à reflux dans l'éthanol 95 % durant trois périodes consécutives de 1,5 h. Les fractions ont été combinées et le solvant a été évaporé sous pression réduite pour conduire à 74,8 g d'extrait brut (**AK1**, 37 %). L'extrait brut a ensuite été suspendu dans l'eau puis extrait avec du dichlorométhane (3 × 300 mL), suivi de l'acétate d'éthyle (3 × 300 mL). Les phases organiques extraites avec l'acétate d'éthyle ont été rassemblées et le solvant a été évaporé sous pression réduite pour conduire à 48,8 g d'extrait lavé (**AK2**).

3.3.3 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE *K. ANGUSTIFOLIA*

L'extrait lavé a été fractionné par chromatographie sur colonne de résine adsorbante synthétique Diaion™ HP20 (≥ 250 µm) avec comme éluant un mélange MeOH/H₂O (50/50 ; 60/40 ; 75/25 ; 100/0) pour conduire à 9,2335 g d'une fraction contenant l'asébotine (**BK1**) avec un ratio de 75/25. La fraction **BK1** a été séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice F60 (40-63 µm, 60 Å) avec comme éluant un mélange CHCl₃/MeOH (95/5 ; 90/10 ; 85/15 ; 80/20) pour conduire, avec un ratio de 85/15, à 4,7278 g de fraction riche en asébotine (**BK2**) après lyophilisation.

3.3.4 HYDROLYSE DE L'ASÉBOTINE

1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one



Formule chimique: $C_{16}H_{16}O_5$
Masse molaire: 288,30 g/mol

2a

La fraction enrichie en asébotine (**BK2**) (4,7278 g) a été dissoute dans 30 mL d'éthanol 95 % et 42 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 3 N. Le mélange a été agité pendant 2 h à reflux. L'acide a ensuite été neutralisé au $NaHCO_3$: la solution rose-violet devient vert-noir à chaud (violet à température ambiante) lorsque le milieu est neutre. L'éthanol a ensuite été évaporé sous pression réduite et la phase aqueuse a été extraite avec de l'acétate d'éthyle (3×50 mL) en évitant la formation d'une émulsion. Enfin, la phase organique a été séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite pour conduire à 3,8176 g de mélange brut réactionnel. Le mélange brut a été fractionné sur colonne de gel de silice F60 (40-63 μm , 60 Å) avec comme éluant un mélange $CHCl_3/MeOH$ (100/0 ; 95/5 ; 90/10) pour conduire à 0,4460 g d'asébogénine (**2a**) et 2,4736 g d'asébotine réisolée. Une seconde hydrolyse a donc été effectuée pour convertir l'asébotine restante. Ainsi, une quantité supplémentaire de 0,7424 g d'asébogénine a été obtenue pour un total de 1,1884 g (0,6 % m/m du matériel végétal sec) après lyophilisation.

Poudre blanc cassé ; $R_f = 0,42$ (silice, $CHCl_3/MeOH$, 9/1) ; RMN 1H conforme à la littérature⁸ (500 MHz, CD_3OD) : δ 7,06 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,71 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 5,94 (s, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,37 (m, 2H), 2,86 (m, 2H).

3.4 VOLET 2 : MODIFICATION DE L'EXTRAIT DU BOURGEON DE *POPULUS BALSAMIFERA* ET PHARMACOMODULATION DE BALSACONES

3.4.1 EXTRACTION DES BOURGEONS

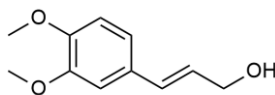
Le matériel végétal a été récolté en avril 2021 au Saguenay–Lac-Saint-Jean. Une quantité de 50,0 g de bourgeons de *Populus balsamifera* a été extraite à reflux dans l'éthanol 95 % durant trois périodes consécutives de 1,5 h. Les fractions ont été combinées et le solvant a été évaporé sous pression réduite pour conduire à 22,5 g d'extrait brut (**AP1**) pour un rendement d'extraction de 45 %. L'extrait brut a ensuite été dissous dans l'acétate d'éthyle puis extrait avec du NaHCO₃ (2 × 150 mL), suivi de l'eau (2 × 150 mL). L'acétate d'éthyle de la phase organique a été évaporé sous pression réduite pour conduire à 17,0 g d'extrait lavé (**AP2**).

3.4.2 OBTENTION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES

L'extrait lavé a été fractionné par chromatographie sur colonne de résine adsorbante synthétique Diaion™ HP20 (≥ 250 µm) avec comme éluant un mélange EtOH/H₂O (50/50 ; 60/40 ; 70/30 ; 80/20) pour conduire à 6,4856 g d'une fraction contenant des proportions quasi-équivalentes de balsacones et de dihydrochalcones (**BP1**) et 0,8921 g d'une fraction riche en balsacones (**BP2**). La fraction **BP1** a été séparée à nouveau par chromatographie sur colonne de résine adsorbante synthétique Diaion™ HP20 (≥ 250 µm) avec comme éluant un mélange EtOH/H₂O (40/60 ; 50/50 ; 60/40) pour conduire à 2,7332 g d'une fraction riche en DHCs (**CP**) après lyophilisation.

3.4.3 SYNTHÈSE DES ALCOOLS 3,4-DIMÉTHOXYCINNAMIQUE (**28**) ET 4-MÉTHOXYCINNAMIQUE (**29**)

(*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-ol



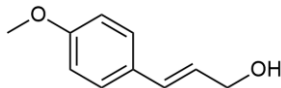
Formule chimique: C₁₁H₁₄O₃
Masse molaire: 194,23 g/mol

28

L'ester **34** (2,5077 ; 11,3 mmol ; 1 éq) a été placé sous atmosphère inerte, puis 140 mL de toluène anhydre ont été ajoutés via une ampoule à addition isobare. L'hydruure de diisobutylaluminium 1M (DIBAL-H) (5 mL ; 50 mmol ; 4,2 éq) a ensuite été ajouté au goutte-à-goutte à 0 °C sur 30 minutes. Le mélange a été agité pendant 1 h à 0 °C. Le méthanol (14 mL) a été ajouté au goutte-à-goutte pour interrompre la réaction en évitant une effervescence, suivi de 70 mL de NaCl saturé en phase aqueuse. Le mélange a été dilué avec de l'eau et extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 200 mL). La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le mélange brut a été fractionné sur colonne de gel de silice F60 (40-63 µm, 60 Å) avec comme éluant un mélange hexane/AcOEt (7/3 ; 6/4 ; 5/5 ; 4/6) pour conduire à 1,5824 g (72 %) d'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (**28**) après lyophilisation.

Poudre blanche, R_f = 0,25 (CHCl₃/MeOH, 9/1); RMN ¹H conforme à la littérature⁶⁷ (500 MHz, CDCl₃) : δ 7,01 – 6,94 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,60 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 6,30 (m, 1H), 4,35 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 1,49 (t, 1H).

(E)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol



Formule chimique: $C_{10}H_{12}O_2$

Masse molaire: 164,20 g/mol

29

L'acide 4-méthoxycinnamique (**35**) (1,5005 g ; 8,4 mmol ; 1 éq) et l'APTS (0,3204 g ; 1,7 mmol ; 0,2 éq) ont été dissout dans 40 mL de méthanol anhydre sous atmosphère inerte. Le mélange a été agité pendant 5 h à reflux. Le méthanol a ensuite été évaporé sous pression réduite et le résidu a été solubilisé dans l'acétate d'éthyle, puis extrait avec une solution aqueuse saturée au $NaHCO_3$ (3 × 50 mL). La phase organique a été séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite pour conduire à l'ester **36** (1,7281 g).

Le composé **36** (1,0606 g ; 5,5179 mmol ; 1 éq) a été placé sous atmosphère inerte, puis 70 mL de toluène anhydre ont été ajoutés via une ampoule à addition isobare. L'hydruure de diisobutylaluminium 1M (DIBAL-H) (25 mL ; 25 mmol ; 4,5 éq) a ensuite été ajouté au goutte-à-goutte à 0 °C sur 30 minutes. Le mélange a été agité pendant 1 h à 0 °C. Le méthanol (7 mL) a été ajouté au goutte-à-goutte pour interrompre la réaction en évitant une effervescence, suivi de 35 mL de NaCl saturé en phase aqueuse. Le mélange a été dilué avec de l'eau et extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 × 200 mL). La phase organique a été séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le mélange brut a été fractionné sur colonne de gel de silice F60 (40-63 μm , 60 Å) avec comme éluant un mélange $CHCl_3/MeOH$ (97/3 ; 95/5) pour conduire à 0,2624 g (28%) d'alcool 4-méthoxycinnamique (**29**) après lyophilisation.

Poudre blanche, R_f = 0,56 ($CHCl_3/MeOH$, 9/1); RMN 1H conforme à la littérature⁶⁸ (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 7,37 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,90 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,60 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 6,28 (dt, J = 15,8 ; 6,0 Hz, 1H), 4,34 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 1,61 (s, 1H), 1,44 (t, J = 5,6 Hz, 1H).

3.4.4 MODIFICATION DE LA FRACTION RICHE EN DIHYDROCHALCONES (CP)

Procédure générale

L'alcool (**26** ; **28-33**) et 100 mg de la fraction riche en dihydrochalcones (**CP**) sont dissous dans 10 mL d'acétate d'éthyle. L'APTS supporté (1 g par mmol d'alcool) est additionné et le mélange est agité pendant 18 h à température ambiante. Le suivi CCM indique la conversion de l'alcool. L'APTS est filtré sous vide avec un entonnoir en verre fritté, le solvant est évaporé et le résidu est lyophilisé pour obtenir la fraction modifiée.

Fraction modifiée avec 10% m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (DP1)

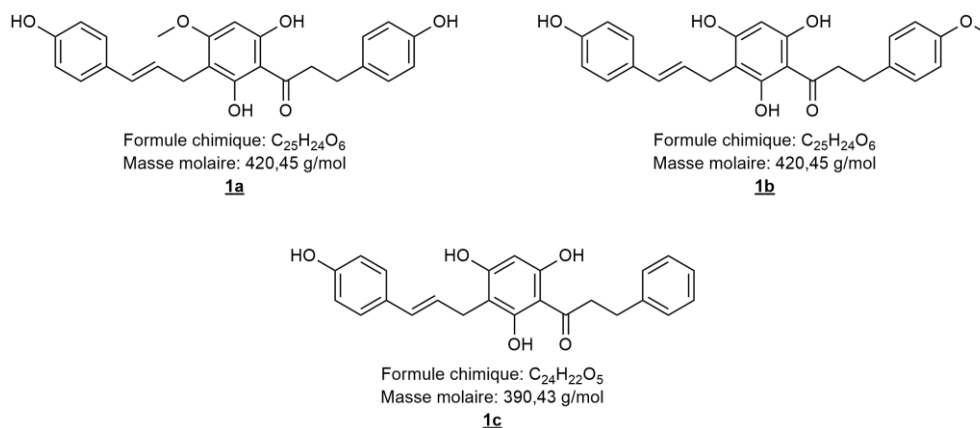


Figure 15. Structures des balsacones A, B et C formées dans les fractions enrichies en balsacones **DP1**, **DP2** et **DP3**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,2 mg de la fraction **CP**, 10,0 mg d'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) et 66,6 mg d'APTS supporté ont conduit à 94,8 mg de la fraction enrichie en balsacones **DP1**.

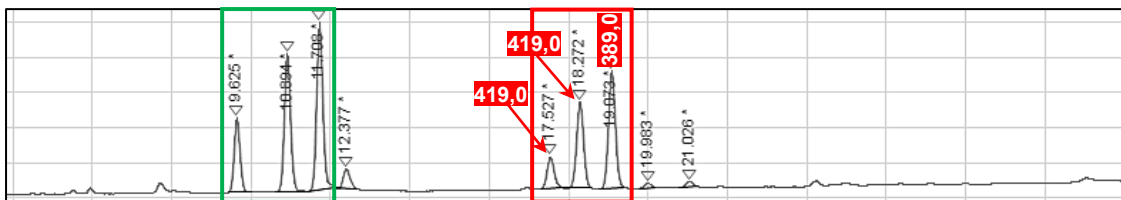


Figure 16. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 10 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP1**). Les rapports m/z des balsacones (**1a-c**) formées sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**). $t_R = 17,5$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_R = 18,2$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_R = 19,0$ min, m/z 389,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₅, 389,15).

Fraction modifiée avec 20% m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (DP2)

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,2 mg de la fraction **CP**, 20,0 mg d'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) et 133,2 mg d'APTS supporté ont conduit à 105,8 mg de la fraction enrichie en balsacones **DP2**.

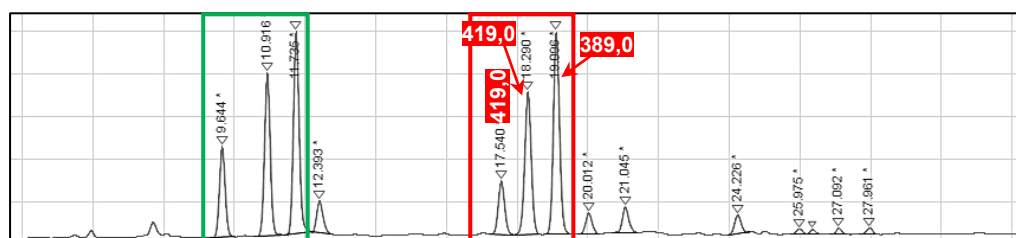


Figure 17. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 20 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP2**). Les rapports m/z des balsacones (**1a-c**) formées sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**). $t_R = 17,5$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_R = 18,2$ min, m/z 419,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₅H₂₃O₆, 419,16); $t_R = 19,0$ min, m/z 389,0 [M-H]⁻ (calculé pour C₂₄H₂₁O₅, 389,15).

Fraction modifiée avec 30% m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (DP3)

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,3 mg de la fraction **CP**, 30,1 mg d'alcool 4-hydroxycinnamique (**26**) et 200,4 mg d'APTS supporté ont conduit à 114,8 mg de la fraction enrichie en balsacones **DP3**.

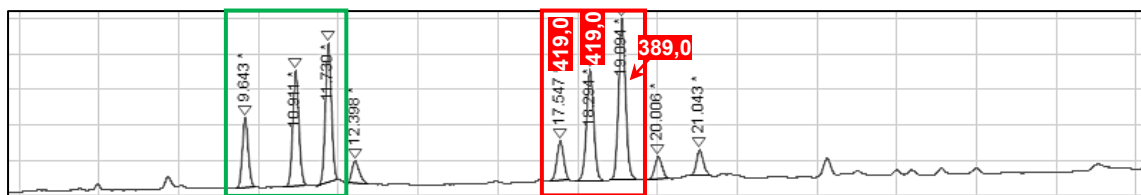


Figure 18. Chromatogramme de la fraction modifiée avec 30 % m/m d'alcool 4-hydroxycinnamique (**DP3**). Les rapports m/z des balsacones (**1a-c**) formées sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**) et celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**). $t_R = 17,5$ min, m/z 419,0 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_6$, 419,16); $t_R = 18,2$ min, m/z 419,0 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_6$, 419,16); $t_R = 19,0$ min, m/z 389,0 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{24}H_{21}O_5$, 389,15).

Fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (EP)

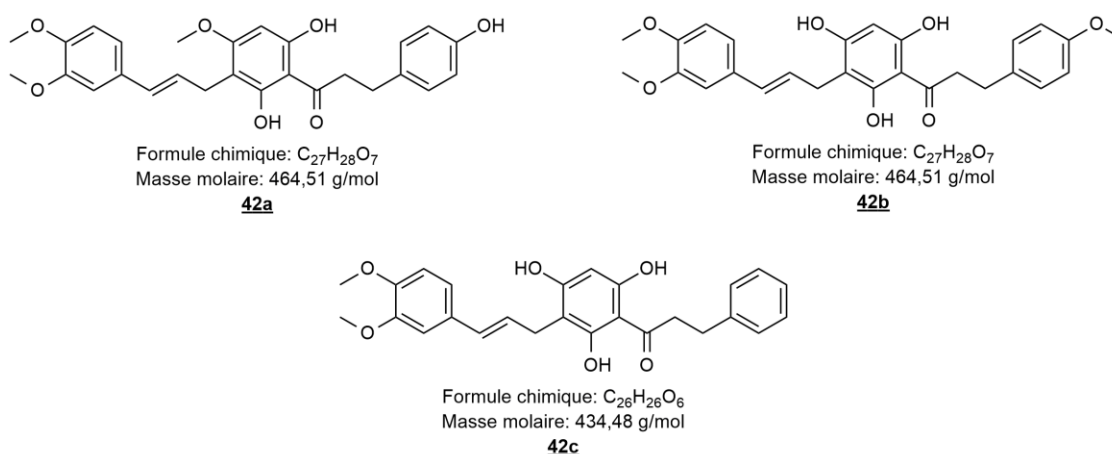


Figure 19. Structures hypothétiques des analogues 3,4-diméthoxycinnamiques formés dans la fraction **EP**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 26,0 mg d'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (**28**) et 134,5 mg d'APTS supporté ont conduit à 113,9 mg de la fraction **EP**.

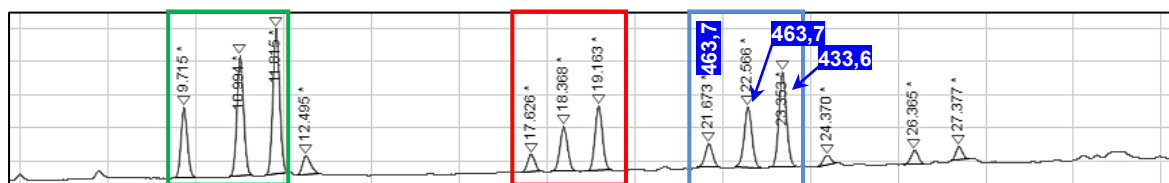


Figure 20. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 3,4-diméthoxycinnamique (**EP**). Les rapports m/z des analogues (**42a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**42a-c**). $t_R = 21,6$ min, m/z 463,7 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{27}H_{27}O_7$, 463,18); $t_R = 22,5$ min, m/z 463,7 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{27}H_{27}O_7$, 463,18); $t_R = 23,3$ min, m/z 433,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{26}H_{25}O_6$, 433,17).

Fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique (FP)

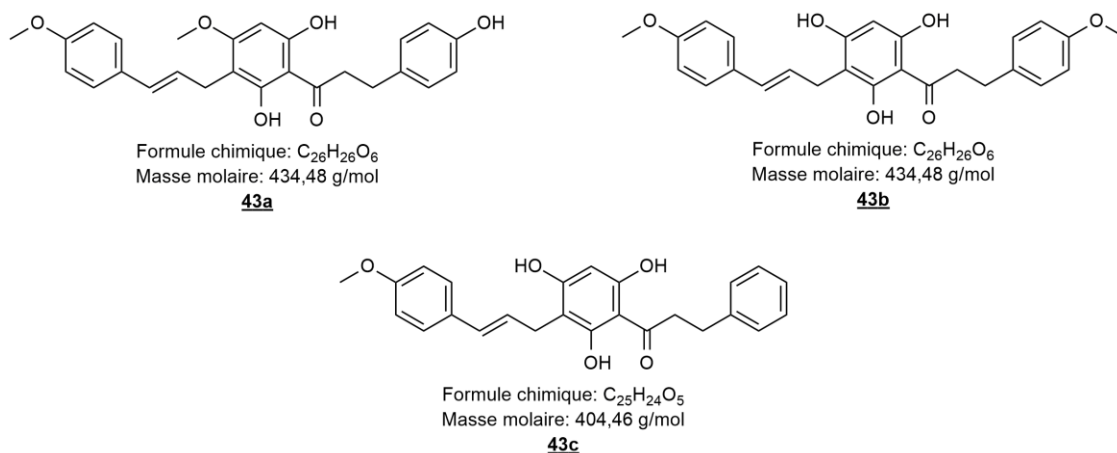


Figure 21. Structures hypothétiques des analogues 4-méthoxycinnamiques formés dans la fraction **FP**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 21,9 mg d'alcool 4-méthoxycinnamique (**29**) et 133,4 mg d'APTS supporté ont conduit à 110,6 mg de la fraction **FP**.

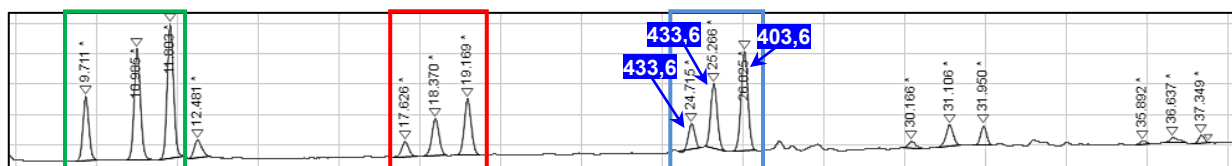


Figure 22. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxycinnamique (**FP**). Les rapports m/z des analogues (**43a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsanones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**43a-c**). $t_R = 24,6$ min, m/z 433,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{26}H_{25}O_6$, 433,17); $t_R = 25,2$ min, m/z 433,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{26}H_{25}O_6$, 433,17); $t_R = 25,9$ min, m/z 403,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_5$, 403,16).

Fraction modifiée avec l'alcool cinnamique (GP)

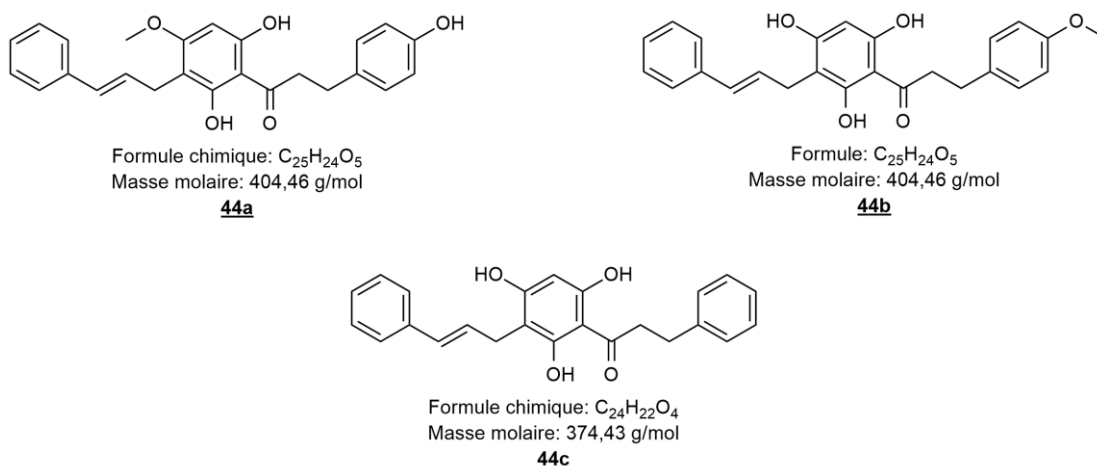


Figure 23. Structures hypothétiques des analogues cinnamiques formés dans la fraction **GP**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 17,1 μ L d'alcool cinnamique (**30**) 98 % et 133,4 mg d'APTS supporté ont conduit à 112,8 mg de la fraction **GP**. L'alcool cinnamique a été placé dans un bain d'eau chaude avant d'être prélevé étant donné son état solide-liquide à température ambiante.

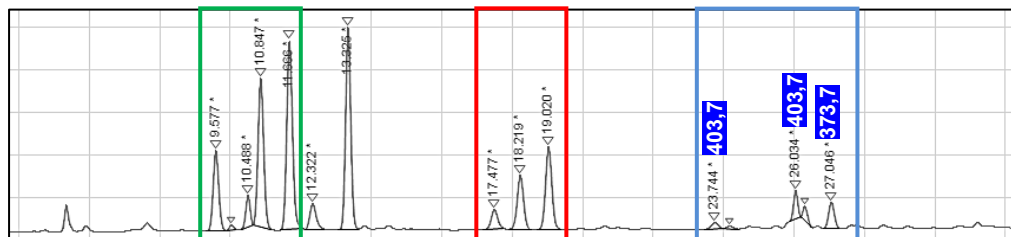


Figure 24. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool cinnamique (**GP**). Les rapports m/z des analogues (**44a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**44a-c**). $t_R = 23,7$ min, m/z 403,7 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_5$, 403,16); $t_R = 26,0$ min, m/z 403,7 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_5$, 403,16); $t_R = 27,0$ min, m/z 373,7 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{24}H_{21}O_4$, 373,15).

Fraction modifiée avec l'alcool coniférylique (HP)

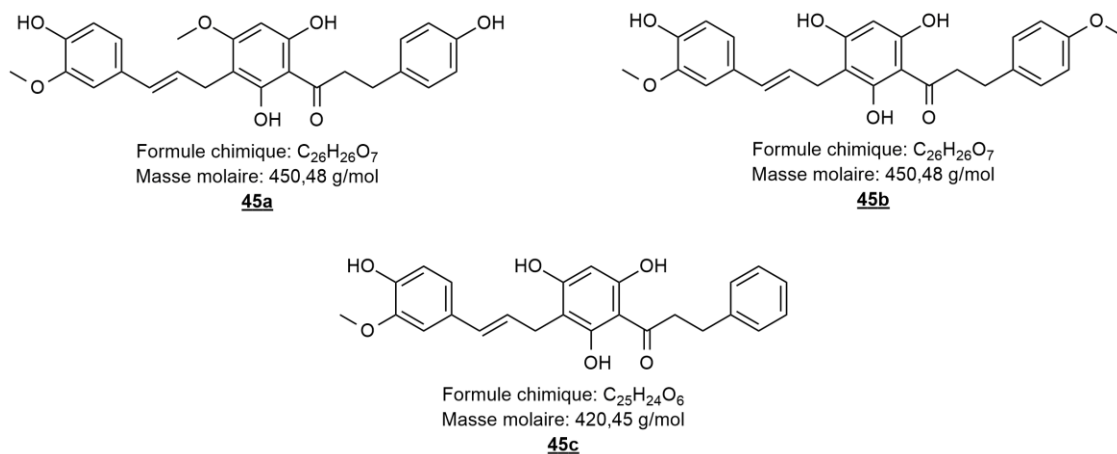


Figure 25. Structures hypothétiques des analogues coniféryliques formés dans la fraction **HP**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 24,0 mg d'alcool coniférylique (**31**) et 133,3 mg d'APTS supporté ont conduit à 116,5 mg de la fraction **HP**.

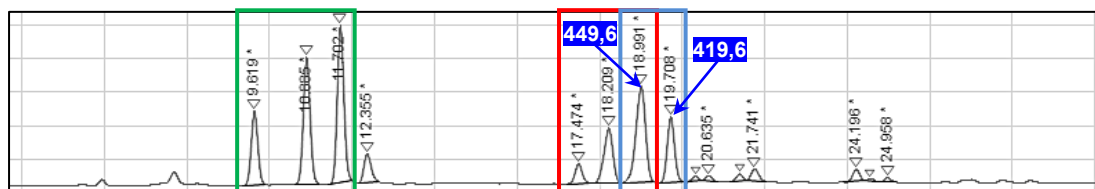


Figure 26. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool coniférylique (**HP**). Les rapports m/z des analogues (**45a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**45a-c**). $t_R = 19,0$ min, m/z 449,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{26}H_{25}O_7$, 449,17); $t_R = 19,0$ min, m/z 449,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{26}H_{25}O_7$, 449,17); $t_R = 19,7$ min, m/z 419,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{25}H_{23}O_6$, 419,16).

Fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (IP)

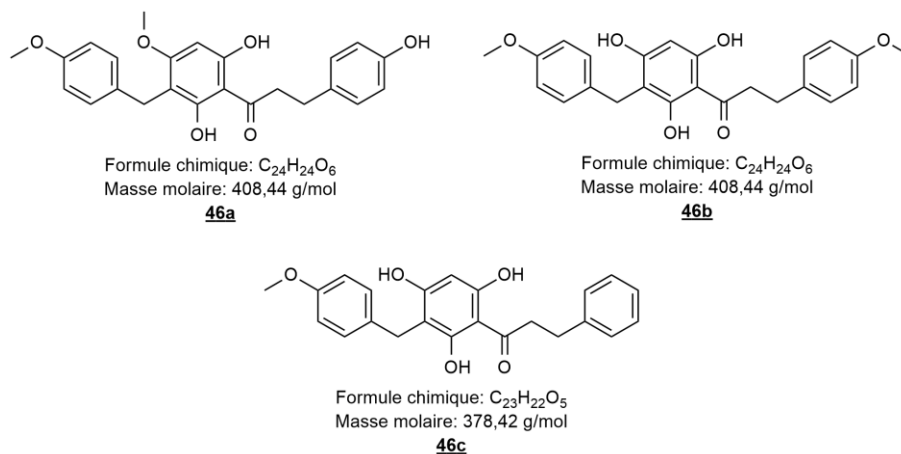


Figure 27. Structures hypothétiques des analogues 4-méthoxybenzyliques formés dans la fraction IP.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 16,9 μ L d'alcool 4-méthoxybenzylique (**32**) 98 % et 133,2 mg d'APTS supporté ont conduit à 113,1 mg de la fraction **IP**. L'alcool 4-méthoxybenzylique a été placé dans un bain d'eau chaude avant d'être prélevé étant donné son état solide à température ambiante.

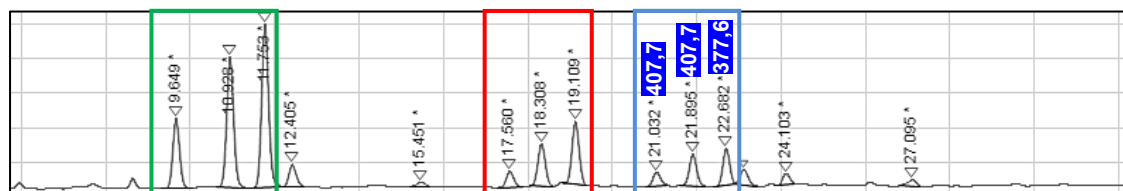


Figure 28. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (IP). Les rapports m/z des analogues (**46a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**46a-c**). $t_R = 21,0$ min, m/z 407,7 [M-H]⁻ (calculé pour $C_{24}H_{23}O_6$, 407,16); $t_R = 21,8$ min, m/z 407,7 [M-H]⁻ (calculé pour $C_{24}H_{23}O_6$, 407,16); $t_R = 22,6$ min, m/z 377,6 [M-H]⁻ (calculé pour $C_{23}H_{21}O_5$, 377,15).

Fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique (JP)

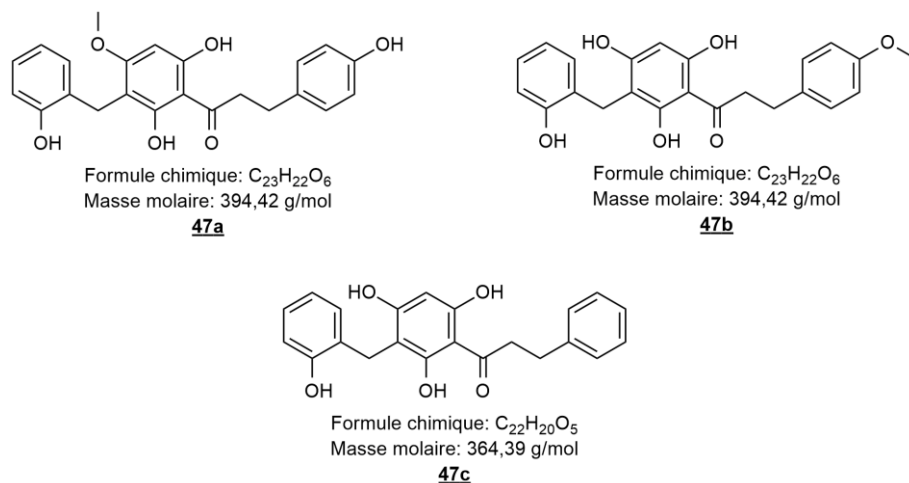


Figure 29. Structures hypothétiques des analogues 2-hydroxybenzyliques formés dans la fraction **JP**.

En suivant la procédure générale ci-dessus, 100,0 mg de la fraction **CP**, 16,5 mg d'alcool 2-hydroxybenzylique (**33**) et 132,9 mg d'APTS supporté ont conduit à 104,1 mg de la fraction **JP**.

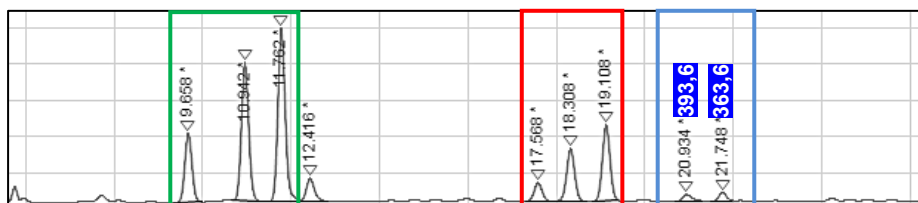


Figure 30. Chromatogramme de la fraction modifiée avec l'alcool 2-hydroxybenzylique (**JP**). Les rapports m/z des analogues (**47a-c**) formés sont mis en évidence au-dessus des pics ; ordonnée en % relatif ; UV 265,4 nm. L'encadré en vert représente la zone des DHCs (**2a-c**), celui en rouge la zone des balsacones (**1a-c**) et celui en bleu la zone des analogues (**47a-c**). $t_R = 20,9$ min, m/z 393,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{23}H_{21}O_6$, 393,14); $t_R = 20,8$ min, m/z 393,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{23}H_{21}O_6$, 393,14); $t_R = 21,7$ min, m/z 363,6 $[M-H]^-$ (calculé pour $C_{22}H_{19}O_5$, 363,13).

3.4.5 TESTS BIOLOGIQUES

Tests antibactériens

L'activité antibactérienne des fractions mères et modifiées a été évaluée sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* selon une méthode de microdilution adaptée de Banfi *et al.*⁶⁵ Les bactéries sont ensemencées dans des plaques de 96 puits (Costar, Corning Inc) à 5×10^3 bactéries/puits pour *E. coli* (ATCC25922) et $3,5 \times 10^4$ bactéries/puits pour *S. aureus* (ATCC25923). Les cultures bactériennes sont traitées avec 100 μ L des fractions dissoutes dans l'éthanol à différentes concentrations, et diluées dans un bouillon nutritif. La concentration maximale en éthanol est de 0,25 % v/v pour éviter la toxicité du solvant. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 24 h. L'absorbance est ensuite mesurée à 600 nm. La gentamycine est utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés par la concentration minimale qui inhibe de 90 % la croissance bactérienne (CMI₉₀). Deux expériences ont été conduites indépendamment et chacun des essais a été reproduit en triplicata.

Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité des fractions mères et modifiées a été évaluée sur les cellules fibroblastes humains normaux WS-1. Les cellules WS-1 sont placées dans des plaques à 96 puits (Costar, Corning Inc) à 5×10^3 cellules/puits dans 100 μ L de milieu de culture (DMEM, solution de 10 % de sérum foetal bovin, vitamines, pénicilline et streptomycine). Les plaques sont incubées pendant 24 h. Les cultures cellulaires sont traitées avec 100 μ L de fractions dissoutes dans l'éthanol à différentes concentrations, et diluées dans le milieu de culture (DMEM). La concentration maximale en éthanol est de 0,25 % v/v pour éviter la toxicité du solvant. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 48 h. La cytotoxicité est évaluée à l'aide d'un test de fluorométrie Hoechst 33342.⁷¹ La fluorescence est mesurée au lecteur de plaque Fluoroskan Ascent FL (ThermoFisher Scientific) à 355 (excitation) et 460 nm (émission). La daunorubicine est utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés par la concentration minimale qui inhibe de 50 % la croissance cellulaire (IC₅₀). Deux expériences ont été conduites indépendamment et chacun des essais a été reproduit en triplicata.

CONCLUSION

Dans le premier volet du projet, la production d'asébogénine (**2a**) à partir d'un glycoside de dihydrochalcone (**27**) présent dans les parties aériennes de *K. angustifolia* a été réalisée. La méthode mise au point permet de produire efficacement l'asébogénine et permet au passage de valoriser une plante indésirable. L'asébogénine résultant de ce procédé pourra éventuellement être utilisée comme précurseur renouvelable dans l'hémisynthèse verte de la balsacone A (**1a**) ou de nouveaux analogues.

Le deuxième volet de cette maîtrise visait à améliorer les propriétés biologiques de l'extrait du bourgeon de *P. balsamifera* en réalisant l'hémisynthèse *in situ* de balsacones et d'analogues. Pour ce faire, une approche répondant à plusieurs principes de la chimie verte a été employée. Elle constitue, entre autres, une alternative à la synthèse multi-étapes, permet de contourner les précurseurs protégés et d'accéder rapidement à des mélanges complexes de dérivés d'intérêt. L'utilisation de réactifs moins nocifs et de précurseurs biosourcés assure une méthode plus sécuritaire et respectueuse de l'environnement. De cette façon, l'extrait de bourgeon a pu être modifié avec différents alcools pour former des balsacones (**1a-c**) et des analogues. Tous les extraits modifiés obtenus sont actifs contre *S. aureus* à des concentrations non toxiques pour les fibroblastes humains normaux (WS-1). La modulation dans l'extrait avec l'alcool 4-méthoxybenzylique (**32**) a conduit à un extrait modifié dont l'activité antibactérienne contre *S. aureus* paraît supérieure à celle de l'extrait enrichi en balsacones. La poursuite de ces travaux permettrait de perfectionner la méthode de production d'analogues de molécules antibactériennes, par exemple, en utilisant une fraction riche en DHCs exempte de balsacones. Additionnellement, l'évaluation de l'activité des fractions modifiées contre les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline permettrait de dresser un meilleur portrait de leur potentiel bioactif.

LISTE DE RÉFÉRENCES

- 1) Nicolaou, K. C.; Rigol, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *J. Antibiot.* **2018**, 71(2), 153-184.
- (2) Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm. Ther.* **2015**, 40(4), 277-283.
- (3) Gould, I. M.; Bal, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* **2013**, 4(2), 185-191.
- (4) Otto, M. MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* **2012**, 14(10), 1513-1521.
- (5) Murray, C. J. L.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G. R.; 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.
- (6) World Health Organization. *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (consulté le 17 août 2023).
- (7) Rossiter, S. E.; Fletcher, M. H.; Wuest, W. M. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* **2017**, 117(19), 12415-12474.
- (8) Lavoie, S.; Legault, J.; Simard, F.; Chiasson, É.; Pichette, A. New antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 1631-1633.
- (9) 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. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 4188-4198.
- (10) Côté, H.; Pichette, A.; Simard, F.; Ouellette, M.-È.; 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.
- (11) 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, 256.
- (12) 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, 3523.
- (13) Burmaoğlu, S. Total Syntheses of Balsacone B and Balsacone C. *J. Turk. Chem. Soc. A: Chem.* **2017**, 4(3), 709-720.
- (14) 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 Sustain. Chem. Eng.* **2020**, 8, 6194-6199.
- (15) Ardaillou, A.; Alsarraf, J.; Legault, J.; Simard, F.; Pichette, A. Hemisynthesis and Biological Evaluation of Cinnamylated, Benzylated, and Prenylated Dihydrochalcones from a Common Bio-Sourced Precursor. *Antibiotics* **2021**, 10, 620.

- (16) Kumar, R.; Van der Eycken, E. V. Recent approaches for C–C bond formation *via* direct dehydrative coupling strategies. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1121-1146.
- (17) 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), 1373.
- (18) Mallik, A. U.; Inderjit. *Kalmia angustifolia*: Ecology and Management. *Weed Technol.* **2001**, *15*(4), 858-866.
- (19) Yamasaki, S. H.; Fyles, J. W.; Egger, K. N.; Titus, B. D. The effect of *Kalmia angustifolia* on the growth, nutrition, and ectomycorrhizal symbiont community of black spruce. *For. Ecol. Manag.* **1998**, *105*(1), 197-207.
- (20) Mallik, A. U. Post-Fire Habitat Heterogeneity Leads to Black Spruce–*Kalmia* L. Shrub Savannah Alternate State. *Forests* **2022**, *13*, 570.
- (21) Jensen, K. I. N.; Yarborough, D. E. An Overview of Weed Management in the Wild Lowbush Blueberry—Past and Present. *Small Fruits Rev.* **2004**, *3*, 229-255.
- (22) Keizer, J. P.; MacQuarrie, K. T. B.; Milburn, P. H.; McCully, K. V.; King, R. R.; Embleton, J. Long-Term Ground Water Quality Impacts from the Use of Hexazinone for the Commercial Production of Lowbush Blueberries. *Ground Water Monit. Remediat.* **2001**, *21*, 128-135.
- (23) Walsh, C.; Wright, G. Introduction: Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, *105*(2), 391-394.
- (24) Canada's Chief Public Health Officer. *Handle with care: preserving antibiotics now and into the future. Chief Public Health Officer of Canada's Spotlight Report 2019.* **2019**. https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/documents/corporate/publications/chief-public-health-officer-reports-state-public-health-canada/preserving-antibiotics/Final_CPHO_Report_EN_June6_2019.pdf (consulté le 4 septembre 2024).
- (25) Keyes, K.; Lee, M. D.; Maurer, J. J. *Antibiotics: mode of action, mechanisms of resistance, and transfer*. Microbial food safety in animal agriculture: Current topics, Iowa State Press **2003**, 45-56.
- (26) Etebu, E.; Arikepar, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2016**, *4*(2016), 90-101.
- (27) Dowling, A.; O'Dwyer, J.; Adley, C. *Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance*. Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs, Formatex Research Center **2017**, 536-545.
- (28) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72-80.
- (29) Adediji, W. A. The Treasure Called Antibiotics. *Ann. Ib. Postgrad. Med.* **2016**, *14*(2), 56-57.
- (30) Khan, M. F. Brief history of *Staphylococcus aureus*: a focus to antibiotic resistance. *EC Microbiol.* **2017**, *5*(2), 36-39.
- (31) Abraham, E. P.; Chain, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146*(3713), 837-837.
- (32) Lobanovska, M.; Pilla, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J. Biol. Med.* **2017**, *90*(1), 135-145.

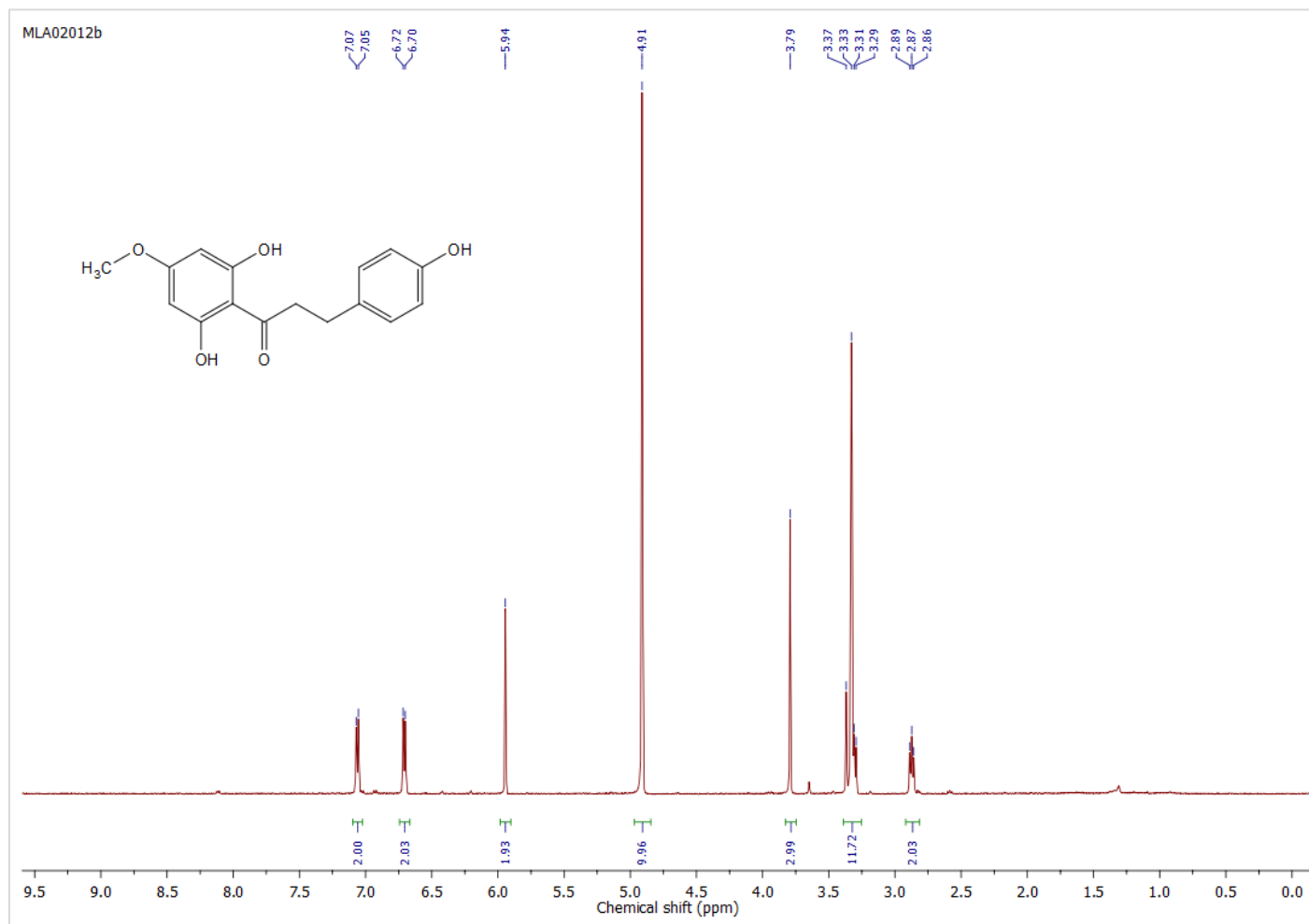
- (33) Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*(9), 1265-1273.
- (34) Chambers, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*(4), 781-791.
- (35) Stapleton, P. D.; Taylor, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.* **2002**, *85*, 57-72.
- (36) Reygaert, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*(3), 482-501.
- (37) Lai, C. K. C.; Ng, R. W. Y.; Leung, S. S. Y.; Hui, M.; Ip, M. Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches – An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *181*, 114078.
- (38) Hartman, B. J.; Tomasz, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **1984**, *158*(2), 513-516.
- (39) Utsui, Y.; Yokota, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*(3), 397-403.
- (40) Peacock, S. J.; Paterson, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 577-601.
- (41) Mlynarczyk-Bonikowska, B.; Kowalewski, C.; Krolak-Ulinska, A.; Marusza, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(15).
- (42) D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **2011**, *477*(7365), 457-461.
- (43) Larsson, D. G. J.; Flach, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*(5), 257-269.
- (44) Rather, I. A.; Kim, B. C.; Bajpai, V. K.; Park, Y. H. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*(4), 808-812.
- (45) Luyt, C. E.; Bréchet, N.; Trouillet, J. L.; Chastre, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit. Care* **2014**, *18*(5), 480.
- (46) Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health* **2015**, *109*(7), 309-318.
- (47) Marshall, B. M.; Levy, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*(4), 718-733.
- (48) Economou, V.; Gousia, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* **2015**, *8*, 49-61.
- (49) Larsson, D. G. J. Antibiotics in the environment. *Upsala J. Med. Sci.* **2014**, *119*(2), 108-112.
- (50) Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3903-3910.

- (51) Martínez, J. L.; Fajardo, A.; Garmendia, L.; Hernandez, A.; Linares, J. F.; Martínez-Solano, L.; Sánchez, M. B. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, 33(1), 44-65.
- (52) Kolář, M. Bacterial Infections, Antimicrobial Resistance and Antibiotic Therapy. *Life* **2022**, 12(4), 468.
- (53) O'Neill, J. *Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations*. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (consulté le 5 août 2024).
- (54) Uprety, Y.; Asselin, H.; Dhakal, A.; Julien, N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2012**, 8(1), 7.
- (55) VanWyk, B.-E.; Wink, M. *Medicinal Plants of the World* **2004**.
- (56) Clark, J. H. Green chemistry: challenges and opportunities. *Green Chem.* **1999**, 1(1), 1-8.
- (57) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39(1), 301-312.
- (58) Rivière, C. Chapter 7 - Dihydrochalcones: Occurrence in the Plant Kingdom, Chemistry and Biological Activities. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2016**, 51, 253-381.
- (59) Bouchard, A. R.; Gagnon, M. J. Nutrient status of the lowbush blueberry, Lac-Saint-Jean area, Québec, Canada. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1987**, 18(6), 675-686.
- (60) Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. *Hexazinone dans des prises d'eau potable près de bleuetières, Saguenay-Lac-Saint-Jean*. **2010**. <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/flrivlac/bleuetiere/Hexazinone.pdf> (consulté le 16 avril 2025).
- (61) Desportes, A. Valorisation d'extraits naturels par hémisynthèse biomimétique de dihydrochalcones antibactériennes. Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi. **2024**, 118.
- (62) Quideau, S.; Ralph, J. Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and p-coumaryl alcohol. *J. Agr. Food Chem.* **1992**, 40(7), 1108-1110.
- (63) Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, C. R.; Abou-Shehadeh, S.; Dunn, P. J. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem.* **2016**, 18(1), 288-296.
- (64) Dallman, J.; Lansakara, A.; Nguyen, T.; Weeramange, C.; Hulangamuwa, W.; Rafferty, R. J. The winding road of the uvaretin class of natural products: from total synthesis to bioactive agent discovery. *MedChemComm* **2019**, 10, 1420-1431.
- (65) 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.
- (66) 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.
- (67) Li, S.; Lundquist, K. Reactions of lignin-related cinnamaldehydes and cinnamyl alcohols with borane and sodium tetrahydridoborate. *Acta Chem. Scand.* **1995**, 49, 64-64.

- (68) Liu, P.; Yasir, M.; Ruggi, A.; Kilbinger, A. F. M. Heterotelechelic Polymers by Ring-Opening Metathesis and Regioselective Chain Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57(4), 914-917.
- (69) 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.
- (70) Gormand, P.; Pichette, A.; Legault, J.; Alsarraf, J. Synthesis and Cytotoxicity of Monomethylated Betulinic Acid 3-O- α -L-Rhamnopyranosides. *ACS Omega*. **2023**, 8(39), 36118-36125.
- (71) Rage, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal. Biochem.* **1990**, 191(1), 31-34.

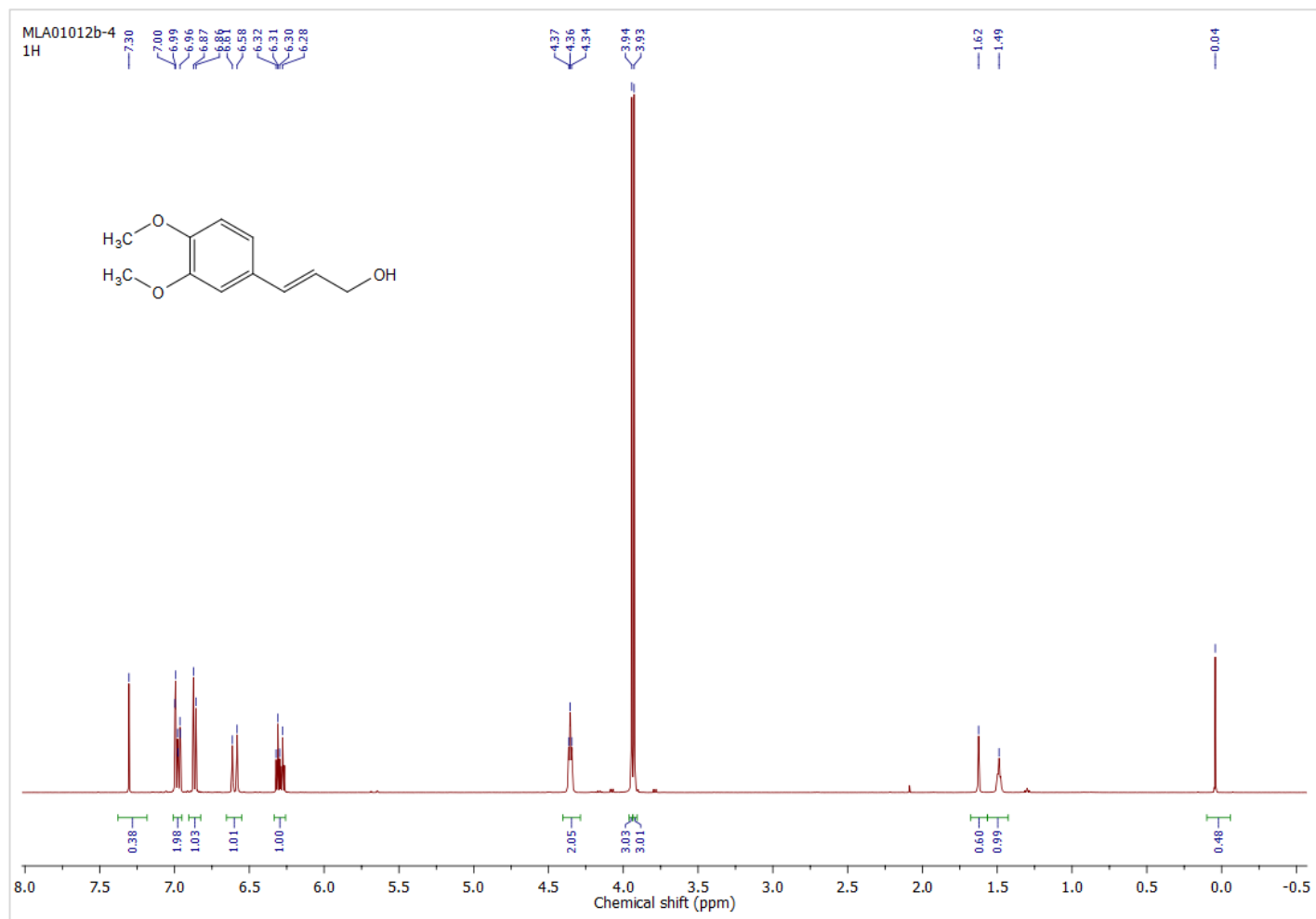
ANNEXE 1

Spectre RMN ^1H du composé **2a**



ANNEXE 2

Spectre RMN ^1H du composé **28**



ANNEXE 3

Spectre RMN ^1H du composé **29**

