

Université du Québec à Chicoutimi

Mémoire présenté à
l'Université du Québec à Chicoutimi
comme exigence partielle de la maîtrise en
ressources renouvelables

Par Pierre Morin
B. Sc. (Chimie)

Contribution à l'étude de la composition chimique de l'écorce de *Larix
laricina*

2007



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

À Amélie

*«Tout homme a le droit de douter de sa tâche
Et d'y faillir de temps en temps.
La seule chose qu'il ne puisse faire, c'est d'oublier. »*

Paolo Coelho

RÉSUMÉ

La forêt boréale québécoise est à la base d'une importante activité économique. Cependant, cette industrie produit des résidus forestiers, dont des écorces, des sciures et des branchages. Ces résidus sont principalement utilisés pour la production d'énergie ou abandonnés sur les sites de coupe. Il serait donc intéressant de valoriser cette ressource, par exemple, dans le secteur biopharmaceutique. En effet, les plantes de la forêt boréale ont été utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour soulager ou pour soigner divers maux. Cependant, très peu d'espèces végétales de la forêt boréale ont fait l'objet d'études approfondies en ce qui concerne leur composition chimique et leur activité biologique. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié la composition chimique d'un extrait bioactif d'écorce de *Larix laricina*. Quatre composés ont été isolés par chromatographie sur gel de silice et identifiés par diverses méthodes spectroscopiques (IR, MS, RMN). Ces composés sont : le 19-acétoxy-13*S*-hydroxylabda-8(17),14-diène (**1**), le 19-oxo-8*R*-hydroxylabda-12(*Z*),14-diènal (**2**), le *cis*-19-hydroxyabienol (**3**) et le 3-méthoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (**4**). La structure des produits **2** et **3** n'avait jamais été rapportée dans la littérature, alors que les produits **1** et **4** sont des composés connus rapportés pour la première fois dans *L. laricina*. La cytotoxicité des produits **1-4** a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses du poumon (A-549) et du côlon (DLD-1) ainsi que sur une lignée de cellule saine (WS-1). Les produits **1** et **2** sont cytotoxiques sur toutes les lignées cellulaires testées, alors que le produit **4** ne présente aucune cytotoxicité. Finalement, le produit **3** montre une activité significative et sélective contre les cellules cancéreuses du côlon sans cytotoxicité pour les cellules saines.

REMERCIEMENTS

C'est à ma famille, à ma conjointe, Amélie Dubé, et au Docteur Pascale Chevallier que je tiens à adresser mes premiers remerciements. À eux seuls, ils m'ont appuyé et soutenu par leur écoute, leurs encouragements et leurs judicieux conseils. Ils ont su éclairer mes yeux lorsque ceux-ci n'y voyaient plus clair.

Un remerciement spécial au Docteur Jean Legault et au Docteur André Pichette, qui ont bien voulu m'accueillir au sein de leur équipe et, par le fait même, ont aussi su supporter un jeune chercheur. Un merci particulier à celui qui a su démontrer une grande patience pour m'apprendre la phytochimie, le Docteur Vakhtang Mshvildadze.

Merci aussi à mes collègues qui m'ont bien diverti, faisant de ce séjour un temps plus léger et agréable.

Un dernier remerciement à Mme Nathalia Matte qui, par son amitié généreuse, m'a non seulement permis de compter une amitié solide de plus dans mon cercle d'ami(e)s, mais aussi de rester sain d'esprit durant les temps les plus difficiles loin de ma famille et loin de ceux que j'aime.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Remerciements	iv
Chapitre 1	1
Chapitre 2	6
2.1 Description du <i>Larix laricina</i>	7
2.2 Utilisations médicinales du <i>Larix laricina</i>	8
2.3 Activité biologique et composition chimique de <i>Larix laricina</i>	10
Chapitre 3	13
3.1 Extraction des produits naturels et analyse de l'extrait par chromatographie sur couche mince	14
3.2 Purification de l'extrait chloroformique.	15
3.2.1 Isolation du 19-acétoxy-13 <i>S</i> -hydroxy-8(17),14-labdadiène (1) et du 8 <i>α</i> -hydroxy- 12 <i>Z</i> ,14-labdadiène-19-al (2) à partir de la fraction F2.....	16
3.2.2 Isolation du <i>cis</i> -19-hydroxyabienol (3) à partir de la fraction F3.	16
3.2.3 Isolation du 3-méthoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (rhapontigénine) (4) à partir de la fraction F4	17
3.3 Identification des produits isolés	18
3.3.1 Identification du 19-acétoxy-13 <i>S</i> -hydroxy-8(17),14-labdadiène (1)	18
3.3.1.1 Propriétés physiques	18
3.3.1.2 Spectroscopie infrarouge	19
3.3.1.3 Spectrométrie de masse	20

3.3.1.4 Résonance magnétique nucléaire.....	20
3.3.2 Identification du 8 α -hydroxy-12Z,14-labdadiène-19-al (2).....	23
3.3.2.1 Propriétés physiques	23
3.3.2.2 Spectroscopie infrarouge	23
3.3.2.3 Spectroscopie de masse	24
3.3.2.4 Résonance magnétique nucléaire.....	24
3.3.3 Identification du <i>cis</i> -19-hydroxyabienol (3)	27
3.3.3.1 Propriétés physiques	27
3.3.3.2 Spectroscopie infrarouge	27
3.3.3.3 Spectroscopie de masse	28
3.3.3.4 Résonance magnétique nucléaire.....	28
3.3.4 Identification du 3-methoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (rhapontigénine) (4)....	31
3.3.4.1 Propriétés physiques	31
3.3.4.2 Spectroscopie infrarouge	31
3.3.4.3 Spectroscopie de masse	32
3.3.4.4 Résonance magnétique nucléaire.....	32
3.4 Confirmation de la similitude structurale entre les produits 2 et 3.....	33
3.5 Évaluation <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des produits 1-4 isolés de l'écorce de <i>L. laricina</i>	34
Chapitre 4.....	36
Chapitre 5.....	39
5.1 Généralités.....	40
5.1.1 Solvants et réactifs	40
5.1.2 Appareil pour mesurer le point de fusion.....	40
5.1.3 Appareil pour mesurer l'indice de rotation	41

5.1.4	Appareil de spectroscopie infrarouge.....	41
5.1.5	Appareil de résonance magnétique nucléaire.....	41
5.1.6	Appareil HPLC/MS.....	42
5.1.7	Appareil HPLC semi-préparatif.....	43
5.1.8	Appareil de spectrométrie de masse.....	43
5.2	Matériel végétal.....	43
5.3	Extraction et isolation.....	44
5.4	Synthèse du 19-oxo-8R-hydroxylabda-12(Z),14-dienal (2) à partir du <i>cis</i> 19-hydroxyabienol (3).....	49
5.5	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité anticancéreuse.....	50
	bibliographie.....	52

TABLE DES FIGURES

Figure 1.	<i>L. laricina</i> en automne.....	7
Figure 2.	Répartition géographique du <i>L. laricina</i> en Amérique du Nord.....	8
Figure 3.	Glycosides isolés des aiguilles de <i>L. laricina</i>	12
Figure 4.	CCM de l'extrait brut au chloroforme et des fractions 1 à 5.....	14
Figure 5.	CCM en phase inverse de l'extrait brut et des produits isolés.....	18

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Utilisation médicinale du <i>L. laricina</i> par les amérindiens d'Amérique du Nord	9
Tableau 2. Rendement d'extraction de l'extrait chloroformique et pourcentages de récupération des fractions.....	15
Tableau 3. Rendement d'isolation des différents composés purifiés.....	17
Tableau 4. Analyse du spectre infrarouge du produit 1.....	19
Tableau 5. Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit 1.....	21
Tableau 6. Analyse du spectre infrarouge du produit 2.....	23
Tableau 7. Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit 2.....	26
Tableau 8. Analyse du spectre infrarouge du produit 3.....	27
Tableau 9 Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit 3.....	28
Tableau 10. Analyse du spectre infrarouge du produit 4.....	32
Tableau 11 Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit 4.....	33
Tableau 12. Cytotoxicité des produits 1-4 isolés de l'écorce de <i>L. laricina</i>	35

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : SPECTRES DU 19-ACÉTOXY-13S-HYDROXY-8(17),14-LABDADIÈNE (1)

ANNEXE 2 : SPECTRES DU 8A-HYDROXY-12Z,14-LABDADIÈNE-19-AL (2)

ANNEXE 3 : SPECTRES DU CIS-19-HYDROXYABIENOL (3)

ANNEXE 4 : SPECTRES DE LA RHAPONTIGÉNINE (4)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique	IC ₅₀	<i>Concentration d'inhibition</i>
		IR	Spectroscopie infrarouge
CCM	Chromatographie sur couche mince	J	Constante de couplage
CHCl ₃	Chloroforme	KBr	Bromure de potassium
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>	m	Multiplet
d	Doublet	MeOH	Méthanol
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>	MS	Spectroscopie de masse
		NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
EtOAc	Acétate d'éthyle		
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	N/S	Non spécifié
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple bond Correlation</i>	R _f	Facteur de rétention
		RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatographie</i>	s	Singulet
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>	t	Triplet
		t _R	Temps de rétention

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'industrie forestière exploite la plupart des conifères de la forêt boréale pour produire principalement du bois d'œuvre ou du papier. Ses ressources forestières sont donc à la base d'une importante activité économique qui génère annuellement plusieurs milliards de dollars [1]. Malheureusement, cette industrie produit aussi des milliers de tonnes de résidus forestiers, dont des écorces, des sciures et des branchages [2]. Ces résidus sont utilisés pour la production d'énergie ou abandonnés sur les sites de coupe. Il serait donc intéressant de mieux valoriser cette ressource, par exemple, dans le secteur biopharmaceutique. En effet, les plantes de la forêt boréale ont été très utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour soulager ou pour soigner divers maux [3-8]. Il est aussi intéressant de mentionner que les produits d'origine végétale sont une source importante de nouveaux médicaments. En effet, on estime qu'entre 1981 et 2002, 65 à 75 % des antibiotiques et des anticancéreux inscrits au registre de la *Food and Drug Administration* (FDA) étaient d'origine naturelle [9, 10]. De plus, depuis 1998, 21 nouveaux médicaments d'origine naturelle ont été mis sur le marché [11, 12]. De ces nouveaux agents thérapeutiques, on retrouve la galantamine (isolée de *Galanthus woronoii*), un médicament pour le traitement de l'Alzheimer [12], l'acide mycophénolique (isolée de *Penicillium brevicompactum*), un immunosuppresseur développé par Novartis et prescrit lors des greffes de rein [13], et la daptomycine (isolée de *Streptomyces roscosporus*), un antibactérien efficace contre les souches bactériennes multi-résistantes [14]. Un autre exemple qui dénote bien l'importance des produits naturels dans l'industrie pharmaceutique est le Lipitor. Ce dérivé synthétique des méstatatines, isolée pour la première fois de *Penicillium citrinum*, a été, entre 2000 et 2003, non seulement l'agent

hypolipidémiant le plus prescrit, mais aussi le médicament le plus vendu dans le monde [15].

Étonnamment, moins de 10 % des espèces du règne végétal ont été étudiées pour leur activité biologique [9], et la forêt boréale n'y fait pas exception. Le cas du taxol (paclitaxel) est un exemple qui illustre bien le potentiel de la forêt boréale. Le taxol est un alcaloïde diterpénique d'origine végétale utilisé couramment comme agent anticancéreux [10]. En 1971, le taxol a été isolé et identifié comme le produit responsable de l'activité anticancéreuse des extraits d'écorces de l'if du Pacifique. Il est intéressant de mentionner que ce composé très actif est également présent dans l'if du Canada (*Taxus canadensis*), un petit conifère de la forêt boréale [16]. L'usage du taxol a été approuvé par les autorités américaines dans le traitement du cancer des ovaires (1992), du sein (1994) et du poumon (1999) [17]. La demande en taxol a donc connu une hausse importante dans les années 90 et en 2000, les ventes de taxol ont presque atteint les 2 milliards \$US. La découverte de cette molécule et de son activité biologique a permis d'améliorer significativement le traitement de plusieurs cancers. Cet exemple suggère que l'étude approfondie de la biomasse de la forêt boréale pourrait permettre de découvrir d'autres nouveaux composés utiles pour traiter le cancer.

Le laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC) s'intéresse depuis plusieurs années aux produits naturels bioactifs issus de la forêt boréale québécoise. Des études préliminaires *in*

vitro, menés par le LASEVE, ont permis de constater que certaines plantes encore méconnues sur le plan de leur composition chimique et de leur activité biologique méritaient d'être davantage étudiées. À l'issue de ces essais, l'extrait chloroformique de l'écorce du mélèze larcin DU ROI K. KOCH (*Larix laricina*), un conifère principalement utilisé par l'industrie des pâtes et papiers [2], s'est avéré posséder une activité cytotoxique intéressante sur les cellules cancéreuses du poumon (A-549) et du côlon (DLD-1). À notre connaissance, aucune étude liant cette activité à la composition chimique du *L. laricina* n'avait été rapportée jusqu'alors. Le principal objectif de ce travail de recherche consistait à identifier les composés majoritaires de l'extrait chloroformique d'écorces de *L. laricina* et à évaluer leur activité anticancéreuse. Pour atteindre cet objectif, nous devons réaliser les objectifs spécifiques suivants:

- i) Fractionner l'extrait actif par chromatographie sur colonne afin d'en réduire la complexité;
- ii) Isoler les composés majoritaires des différentes fractions et identifier ceux-ci par diverses méthodes spectroscopiques (RMN, IR, MS);
- iii) Évaluer la cytotoxicité des composés isolés sur des lignées de cellules cancéreuses et saines.

Pour bien situer le contexte de la recherche, une brève revue de la littérature est présentée au chapitre 2. Cette section décrit les principales caractéristiques du *L. laricina* et rapporte également son utilisation médicinale par les Amérindiens. D'autre part, quelques

études portant sur la composition chimique et l'activité biologique du *L. laricina* sont rapportées. Le chapitre 3 (résultats et discussion), quant à lui, détaille les résultats de l'isolation et de l'identification de quelques produits naturels des écorces de *L. laricina*. Ces travaux ont notamment permis d'élucider la structure de deux nouveaux composés diterpéniques qui n'avaient jamais encore été rapportés dans la littérature. Les résultats relatifs à l'évaluation antitumorale des composantes de cette écorce sont également présentés et discutés au chapitre 3. En guise de conclusion, les principaux résultats concernant l'isolation des composés d'écorces de *L. laricina* sont mis en évidence et quelques perspectives futures sont discutées (chapitre 4). Finalement, le chapitre 5 présente l'approche expérimentale utilisée dans le cadre de la réalisation de ce travail de recherche.

CHAPITRE 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Description du *Larix laricina*

Les conifères du genre *Larix* font partie de la famille des Pinacées, du groupe des gymnospermes, c'est-à-dire qui ont des graines protégées par des écailles. On y retrouve essentiellement neuf espèces de mélèze [18], dont trois sur le territoire canadien : *L. laricina*, *L. occidentalis* et *L. lyalli* [19, 20]. De ces trois espèces, *L. laricina* est le plus abondant et le seul poussant en sol québécois, principalement dans les tourbières ou les terrains humides [20, 21]. Aussi appelé épinette rouge ou Tamarack, ce conifère, qui croît rapidement dans des climats relativement rudes [22], peut atteindre 15 mètres de haut. Il est caractérisé par des aiguilles de couleur bleu-gris d'une longueur de 10-25 mm. Son feuillage prend une couleur jaunâtre en automne (figure 1). De plus, il est le seul conifère d'Amérique à perdre ses aiguilles en saison hivernale.

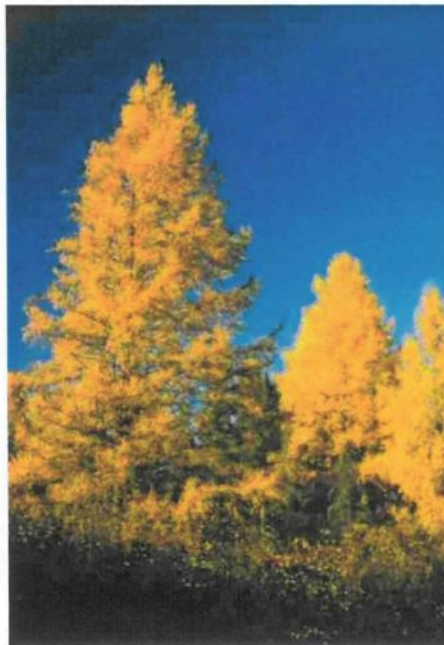


Figure 1. *L. laricina* en automne.

On retrouve le *L. laricina* sur tout le territoire des Maritimes, du Québec et de l'Ontario. On peut aussi le retrouver au nord du Manitoba jusqu'au Yukon. La figure 2 présente sa répartition géographique en Amérique du Nord.



Figure 2. Répartition géographique du *L. laricina* en Amérique du Nord.

2.2 Utilisations médicinales du *Larix laricina*

La médecine traditionnelle amérindienne compte plusieurs exemples d'utilisation du *L. laricina* (Tableau 1). Les tribus iroquoises, algonquines, abénakis et montagnaises employaient entre autres le mélèze contre les infections de la gorge [3, 4, 23, 24]. Les Algonquins et les Chippewas utilisaient également l'écorce du *L. laricina* pour soulager les

symptômes associés à l'anémie [3, 4]. Certains usages contre les maladies vénériennes, les rhumatismes et la tuberculose ainsi que comme laxatif, analgésique et stimulant ont aussi été rapportés [4, 8, 25, 26].

Tableau 1. Utilisation médicinale du *L. laricina* par les amérindiens d'Amérique du Nord.

Tribus	Partie de la plante	Utilisation	Référence
Abenaki	Écorce et racine (décoction ou infusion)	Toux	3
	Aiguille et fruit (infusion)	Toux	3, 8
Algonguin	Aiguille (cataplasme)	Désinfectant	3, 8
	Branche (Infusion)	Laxative	8
Chippewas	Écorce (infusion)	Anémie	3, 5-7
	Écorce interne (Cataplasme)	Brûlure	3, 4
Iroquois	N/S (décoction fermentée)	Analgésique	3
	Écorce interne (décoction)	Antirhumatique	3, 4
	Écorce (décoctions)	Toux	3, 4
	N/S (décoction fermentée)	Stimulant	3
	N/S (cataplasme)	Gonorrhée	3
Malacite	Écorce (infusion)	Toux	5
	Écorce (infusion)	Tuberculose	3, 5-7
	Écorce (infusion)	Gonorrhée	5
Micmac	Écorce (N/S)	Toux	3, 7
	Écorce (décoction / cataplasme)	Usage dermatologique	7
	Écorce (N/S)	Stimulant	3, 7

	Écorce (infusion)	Tuberculose	3, 7
	Écorce (infusion)	Gonorrhée	5
Montagnais	Bourgeon et écorce (infusion)	Expectorant	6
Ojibwas	Aiguille (inhalation, fumigation)	Désinfectant	8
	Aiguille, racine et écorce (cataplasme)	Analgésique	8

N/S : non spécifié

2.3 Activité biologique et composition chimique de *Larix laricina*

Plusieurs recherches à caractère écologique ont été rapportées au sujet du *L. laricina*. La plupart d'entre elles portent sur la croissance ou sur la morphologie de ce conifère [27-30]. Outre ces études, peu de travaux approfondis sur la composition chimique et l'activité biologique ont été effectués à ce jour sur le *L. laricina*.

Certains chercheurs ont démontré le bien-fondé de l'exploitation du *L. laricina* dans les coutumes amérindiennes. Parmi eux, des chercheurs de Cambridge ont montré qu'un sucre, l'arabinogalactan, contenu dans le bois de plusieurs espèces de mélèzes [31, 32], dont le *L. laricina* [33], avait un effet bénéfique sur les maladies hépatiques [31, 34]. D'autres études récentes ont aussi dévoilé que l'arabinogalactan semble stimuler l'activité immunologique par une augmentation de monocytes en circulation dans le sang [35, 36].

Owen et Johns ont évalué l'effet d'extraits de différents *Larix* sur l'inhibition de la xanthine oxydase, enzyme responsable de la goutte [37]. Ils ont démontré qu'un extrait

méthanolique d'écorce interne de *L. laricina* possédait un potentiel d'inhibition important de la xanthine oxydase. Selon eux, les tanins présents dans l'extrait agiraient comme inhibiteur non-spécifique de l'enzyme. Les auteurs rapportent aussi que les flavanoïdes, comme le glycoside-3-O-Kaempferol présent dans les aiguilles de *L. laricina* [38], joueraient le rôle d'inhibiteur.

La composition chimique de la résine de *L. laricina* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse [39]. Plusieurs composés diterpéniques, principalement des acides pimariques et abiétiques, ont été identifiés dans cette matrice. Ces composés ont montré une activité antimicrobienne, antiulcéreuse, antiallergène et contre les maladies cardiovasculaires [40]. Quelques années plus tard, une étude des composés volatiles contenus dans les ramilles et les aiguilles [19] a démontré qu'il existait une variation quantitative des terpènes dans l'huile essentielle de *L. laricina* à travers le Canada. Cette étude a aussi montré que l'espèce, peu importe son emplacement géographique, est principalement riche en composés monoterpéniques (α - et β -pinène, carène, acétate de bornéol et camphène) et contient une faible proportion de composés sesquiterpéniques (nerolidol, farnésol) et diterpéniques (manool, thunbergène).

Niemenn et Bekooy ont analysé des extractibles des aiguilles de *L. laricina* [38, 41]. Ces travaux ont permis d'identifier des glucosides phénoliques et des flavanoïdes (figure 3) présentant une activité biologique anti-oxydante, neuroprotective et antibactérienne [42-44]. Le 3-O-glycoside isorhamnetin, identifié dans l'étude de Niemann [41], s'est aussi

avéré chemopréventif contre le cancer [45]. À notre connaissance, les écorces du *L. laricina* n'ont toutefois jamais fait l'objet d'études approfondies, si ce n'est d'un brevet qui décrit la préparation d'un onguent à partir de l'écorce de *L. laricina* pour traiter l'arthrite [46].

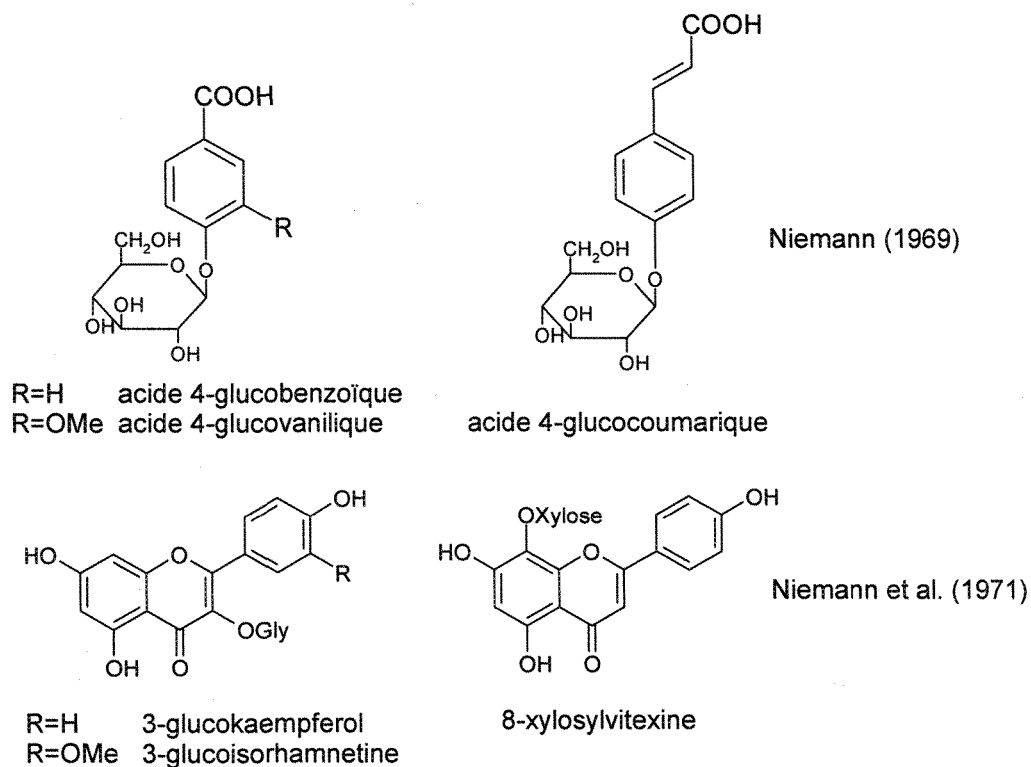


Figure 3. Glycosides isolés des aiguilles de *L. laricina*.

Nos travaux de recherche permettront d'améliorer nos connaissances sur la composition chimique et l'activité anticancéreuse du *L. laricina*. Le chapitre suivant décrit l'isolation et l'identification de quelques composés anticancéreux présents dans les écorces de *L. laricina*.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Extraction des produits naturels et analyse de l'extrait par chromatographie sur couche mince

L'écorce séchée et broyée de *L. laricina* a d'abord été extraite au chloroforme chaud (60°C). Après évaporation du solvant, un résidu de couleur verte a été obtenu avec un rendement de 11,1 % (Tableau 2). La figure 4 présente les chromatographies sur couche mince (CCM) sur gel de silice réalisées avec l'extrait au chloroforme. Le résultat obtenu sur l'extrait brut (colonne 4) montre qu'il est constitué de plusieurs composés. Une première séparation a été effectuée afin de fractionner grossièrement ce mélange complexe.

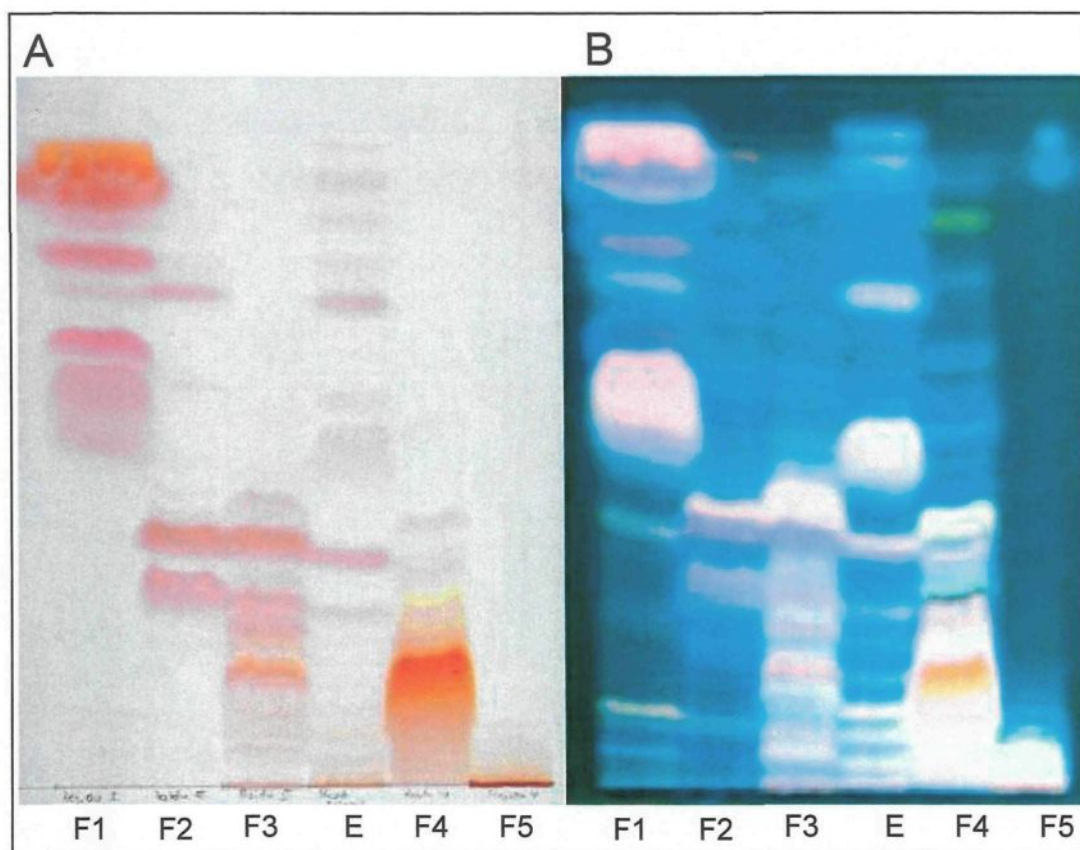


Figure 4. CCM de l'extrait brut au chloroforme (E) et des fractions 1 à 5 (F1, F2, F3, F4 et F5) obtenus par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange de CHCl_3 : MeOH (40 :1). La CCM a été révélée avec l'acide sulfurique 10% dans EtOH et visualisée à la lumière du jour (A) et à l'UV₂₅₆ (B)[47].

3.2 Purification de l'extrait chloroformique.

L'extrait chloroformique a été fractionné grossièrement par trituration dans l'hexane. Une faible quantité de l'extrait au chloroforme s'est solubilisée dans l'hexane. La solution hétérogène a été filtrée afin de séparer le résidu solide du résidu soluble dans l'hexane. L'analyse des CCM a révélé qu'il n'existait aucune ressemblance entre le résidu insoluble et le résidu soluble (résultats non présentés). Le résidu insoluble dans l'hexane a été séparé par chromatographie sur colonne de gel de silice. Cette chromatographie a permis d'obtenir cinq fractions (F1 à F5). La figure 4 présente l'analyse par CCM de ces cinq fractions. Dans le cadre de ce mémoire, seulement les fractions F2, F3 et F4 ont été étudiées en raison de la simplicité de leur composition chimique. Le tableau 2 présente les pourcentages de récupération basés sur la masse d'échantillon (extrait brut) soumis à la chromatographie pour les cinq fractions.

Tableau 2. Rendement d'extraction de l'extrait chloroformique et pourcentages de récupération pour des fractions.

Extrait brut (E)	Fraction 1 (F1)	Fraction 2 (F2)	Fraction 3 (F3)	Fraction 4 (F4)	Fraction 5 (F5)
11,1 %	41,2 %	14,8 %	12,5 %	4,1 %	18,7 %

3.2.1 Isolation du 19-acétoxy-13S-hydroxy-8(17),14-labdadiène (1) et du 8 α -hydroxy-12Z,14-labdadiène-19-al (2) à partir de la fraction F2.

La fraction F2 a été séparée par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant une solution de chloroforme et d'acétate d'éthyle (40:1). Cette séparation a permis d'obtenir le produit **1**, sous la forme d'une huile jaunâtre, ainsi que le produit **2** impure. Le produit **2** a été purifié à nouveau par chromatographie sur gel de silice en phase inverse en utilisant comme éluant un mélange de méthanol et d'eau (4:1). Le produit **2** pur a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche cristalline. Le tableau 2 présente les rendements d'extraction relatifs aux composés isolés. Le rendement global de l'isolation du produit **1** est de 0,01% alors qu'il est de 0,0005% pour le produit **2**. La figure 5 montre l'analyse CCM des produits **1** et **2** isolé à partir de la fraction F2.

3.2.2 Isolation du cis-19-hydroxyabienol (3) à partir de la fraction F3.

La fraction F3 a été séparée par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange de chloroforme et méthanol (20: 1). Une huile jaune a été obtenue. Le produit **3** a été purifié à partir de cette huile par recristallisation dans le chloroforme. Le rendement global de l'isolation du produit **3** est de 0,02 % (Tableau 3). L'analyse HPLC du produit recristallisé ($t_R=7.90$ minutes, voir section «Partie expérimentale») n'a pas permis de révéler la présence d'impuretés. À l'analyse CCM, présenté à la figure 5, le produit **3** forme une tache rouge lorsque ce dernier est soumis aux UV_{256} .

3.2.3 Isolation du 3-methoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (rhapontigénine) (4) à partir de la fraction F4

La fraction F4 a été séparée par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange de chloroforme et de méthanol (20: 1). La chromatographie sur gel de silice a permis d'obtenir le produit **4** impur. Ce dernier a été purifié par HPLC semi-préparatif ($t_R=15,17$ minutes). Le produit **4** a été isolé sous la forme de cristaux violacés. Le rendement global de l'isolation du produit **4** est de 0,002 % (Tableau 3). L'analyse CCM présenté à la figure 5 révèle aux UV_{256} le produit **4** sous la forme d'une tache violacée.

Tableau 3. Rendement d'isolation des différents composés purifiés

	masse isolée (mg)	Rendement d'extraction‡ (%)	Rendement global† (%)
19-acétoxy-13S-hydroxy-8(17),14-labdadiène (1)	217,3	0,2	0,01
8 α -hydroxy-12Z,14-labdadiène-19-al (2)	9,8	0,01	0,0005
cis-19-hydroxyabiéniol (3)	417,4	0,4	0,02
Rhapontigénine (4)	41,0	0,04	0,002

‡ Le rendement d'extraction est calculé en fonction de la quantité d'extrait brut (105,25 g).

† Le rendement global est calculé en fonction de la quantité d'écorce utilisée au départ (2 kg).

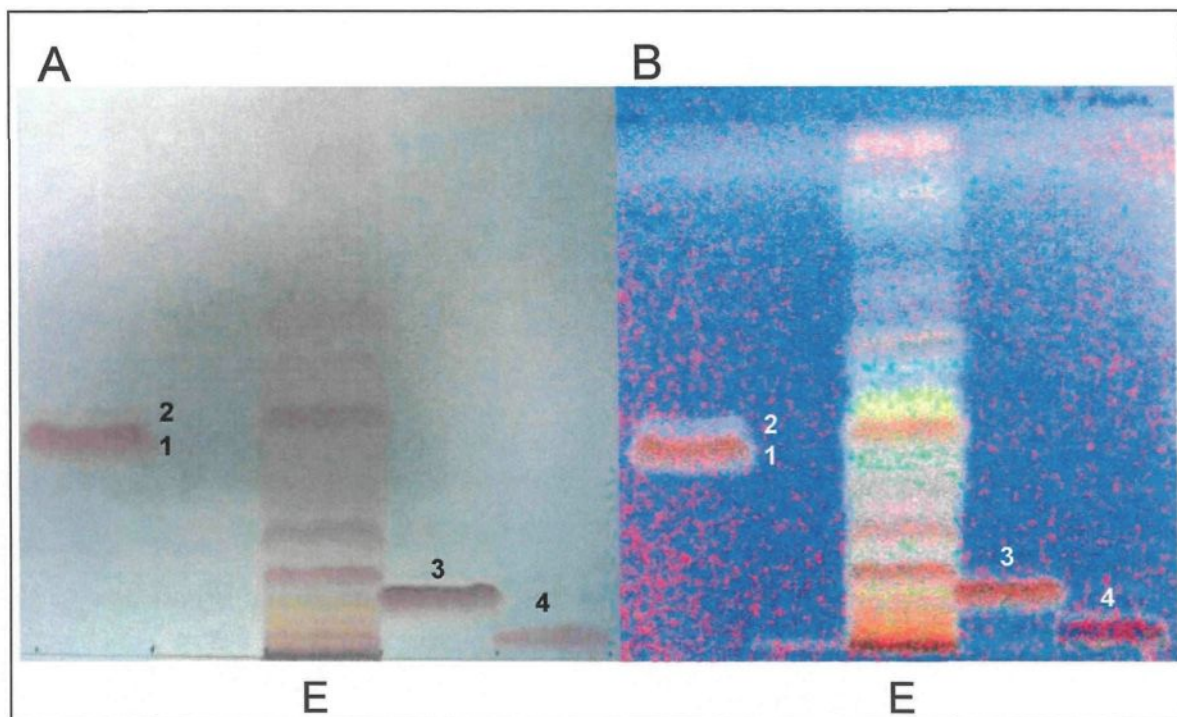


Figure 5. CCM en phase inverse de l'extrait brut (E) et des produits isolés à partir des fractions 2, 3 et 4. L'éluant utilisé est un mélange de MeOH : H₂O (4:1) La CCM a été révélée avec l'acide sulfurique 10% dans EtOH et visualiser à la lumière du jour (A) et à l'UV₂₅₆ (B).

3.3 Identification des produits isolés

3.3.1 Identification du 19-acétoxy-13S-hydroxy-8(17),14-labdadiène (1)

3.3.1.1 Propriétés physiques

Le pouvoir rotatoire spécifique de l'huile jaune obtenue est $[\alpha]_D^{25} = +12^\circ$ (c = 0,3 CHCl₃), ce qui correspond à celui rapporté dans la littérature pour le 19-acétoxy-13S-

hydroxy-8(17),14-labdadiène [48]. L'indice de réfraction n'a pu être mesuré en raison de la trop faible quantité d'huile disponible.

3.3.1.2 Spectroscopie infrarouge

L'analyse du spectre infrarouge du produit **1** (Tableau 4 et Annexe 1) montre des bandes d'absorption caractéristiques des fonctions alcools (3433 et 1030 cm^{-1}) et esters (1733 et 1243 cm^{-1}). Plusieurs bandes propres aux alcènes (3080, 1450-1370, 910-890 cm^{-1}) sont aussi visibles. Les bandes à 1450 cm^{-1} sont probablement causées par un alcène allylique.

Tableau 4. Analyse du spectre infrarouge du produit **1**

Bande (cm^{-1})	Groupement fonctionnel
3433	Élongation O-H
2933-2846	Élongation C-H
1733	Élongation normale CC(=O)-O-
1643	Élongation C=C
1450-1370	Déformation asymétrique et symétrique C-H alcénique
1243	Élongation acétate
1030	Élongation C-O
913-890	Balancement C-H alcénique

3.3.1.3 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse à haute résolution (impact électronique) donne une masse exacte $[M + Na]^+$ de $371.2559 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui correspond à la formule moléculaire de $C_{22}H_{36}O_3$.

3.3.1.4 Résonance magnétique nucléaire

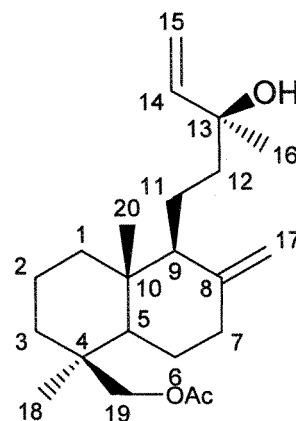
Le tableau 5 présente le détail des spectres RMN ^1H et ^{13}C (voir aussi Annexe 1) du 19-acétoxy-13*S*-hydroxylabda-8(17),14-diène (**1**). Les déplacements chimiques des divers protons de la molécule, de même que leur multiplicité et les valeurs des constantes de couplage y sont détaillés. On y présente également les valeurs de déplacement chimique des atomes de carbone. Leur multiplicité a été déterminée à partir de l'expérience DEPT-135.

L'intégration du spectre RMN ^1H et l'analyse du spectre DEPT-135, indique que la molécule contient 35 protons. La présence d'alcènes observée en IR est corroborée par le spectre RMN ^1H . En effet, l'alcène exocyclique (position 8-17) se remarque par deux singulets à 4.5 et 4.8 ppm [48]. Ce type d'alcène a été validé de nouveau par les déplacements chimiques en RMN ^{13}C (δ 107,1 et 148,0 ppm). L'alcène en position 14-15, peut être observé par la présence de trois doublets de doublets (δ 5,05, 5,20 et 5,90 ppm) intégrant au total pour trois protons. L'absence de couplage autre que l'interaction entre H-14 (δ 5,90 ppm) et H-15 (δ 5,05 et 5,20 ppm) en COSY suggère la présence d'un carbone quaternaire dans l'environnement immédiat du carbone 14. De plus, les corrélations HMBC

entre H-14 et C-13 (δ 73,7 ppm) puis C-16 (δ 27,8 ppm) et les corrélations de H-16 (δ 1,27 ppm) avec C-12 (δ 41,4 ppm), C-13 et C-14 (δ 145,4 ppm) ont permis d'établir hors de tout doute la structure de la chaîne exocyclique principale du produit **1**.

Tableau 5. Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit **1** (CDCl_3)

Position ^a	δ ^1H ^b (mult., J(Hz))	δ ^{13}C ^c
1	1,05 (m); 1,81 (m)	38,9 t
2 [†]	1,50 (m)	19,1 t
3 [†]	1,01 (m); 1,72 (m)	36,4 t
4	-	37,4 s
5	1,24 (m)	56,4 d
6	1,33 (m); 1,83 (m)	24,6 t
7	1,92 (td, 12,6; 4,5); 2,39 (ddd, 12,6; 3,8; 2,2)	38,7 t
8	-	148,0 s
9	1,56 (m)	57,4 d
10	-	39,9 s
11	1,37 (m); 1,54 (m)	17,9 t
12	1,25 (m) ; 1,77 (m)	41,4 t
13	-	73,7 s
14	5,90 (dd, 17,0 ;10,7)	145,4 d
15	5,05 (dd, 10,8; 1,0) ; 5,20 (dd, 17,5; 1,0)	111,8 t
16	1,27 (s)	27,8 q
17	4,53 (br s) ; 4,80 (br s)	107,1 t



Suite du tableau 5 intitulé : Analyse du spectre RMN ^1H et ^{13}C du produit **1** (CDCl_3)

Position ^a	δ ^1H [§] (mult., J(Hz))	δ ^{13}C [§]
18	0,95 (s)	27,7 q
19	3,84 (d, 11,0) ; 4,21 (d, 11,0)	66,9 t
20	0,68 (s)	15,4 q
21	-	171,5 s
22	2,03 (s)	21,2 q

[§]Déplacements chimiques exprimés en ppm

[†]Les signaux peuvent être interchangés

La présence d'un singulet déblindé à 2,03 ppm intégrant pour trois protons suggère la présence d'un groupement acétate. Ce groupement est confirmé par le spectre RMN ^{13}C grâce à un pic carbonyle à 171,5 ppm. Trois méthyles faiblement déblindés (δ 0,68, 0,95, 1,27 ppm) ressortent également de l'analyse du spectre RMN ^1H . La forte corrélation HMBC entre le Me-18 (δ 0,95 ppm) et les carbones 3, 4, 5 et 19 (δ 36,4, 37,4, 56,4, 66,9 ppm), entre H-17 (δ 4,53 et 4,80 ppm) et les carbones 7 (δ 38,7 ppm) et 9 (δ 57,4 ppm) et entre le Me-20 (δ 0,68 ppm) et les carbones 9 et 10 (δ 39,9 ppm) renforce l'hypothèse du squelette proposé. À la lumière de cette analyse, il semble que l'allure générale du spectre RMN ^1H soit similaire à celle du *cis* communal [49]. Finalement, tous les pics en RMN ^{13}C sont conformes à ceux retrouvés dans la littérature pour le 19-acétoxy-13S-hydroxy-8(17),14-labdadiène (**1**) [50].

3.3.2 Identification du 8 α -hydroxy-12Z,14-labdadiène-19-al (2)

3.3.2.1 Propriétés physiques

Le produit **2** est une huile incolore. Le pouvoir rotatoire a été mesuré et une valeur de $[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$ ($c = 0,2$ CHCl₃) a ainsi été obtenue.

3.3.2.2 Spectroscopie infrarouge

Tableau 6. Analyse du spectre infrarouge du produit **2**

Bande (cm ⁻¹)	Groupement fonctionnel
3426	Élongation O-H
2922-2837	Élongation C-H
1716	Élongation C=O
1456-1384	Déformation asymétrique et symétrique C-H alcénique
1163-1081	Élongation C-O-H

Le spectre infrarouge du produit **2** (tableau 6 et annexe 2) est caractérisé par la présence de bandes d'absorption d'une fonction alcool ($\nu_{\max} = 3426$ cm⁻¹ et 1163-1081 cm⁻¹). De plus, on retrouve une bande d'absorption caractéristique d'une fonction carbonyle (aldéhyde) à 1716 cm⁻¹. Les bandes d'absorption observables à 1456 cm⁻¹, 1384 cm⁻¹ et 753 cm⁻¹ sont dues à la présence d'un isoprène.

3.3.2.3 Spectroscopie de masse

L'analyse par HPLC-MS a permis d'identifier des patrons de fragmentation caractéristiques aux squelettes labdaniques. Cette analyse nous a permis d'observer un pic ayant un rapport m/z de $287 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui semble correspondre à un fragment $[\text{M}-\text{OH}]^+$ caractéristique d'une formule moléculaire du type $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Malheureusement, la spectroscopie de masse à haute résolution (impact électronique, positif et négatif) n'a pas permis d'obtenir la masse exacte du produit **2**.

3.3.2.4 Résonance magnétique nucléaire

L'intégration des signaux du spectre RMN ^1H (tableau 7 et annexe 2) indique que le composé est constitué de 32 protons, tandis que le spectre RMN ^{13}C (tableau 7 et annexe II) permet de soupçonner que le produit **2** compte 20 carbones. Ces données corroborent l'analyse HPLC-MS. De plus, la ressemblance spectroscopique entre le produit **2** et le produit **1** suggère que le squelette général de cette molécule était également un diterpène labdanique.

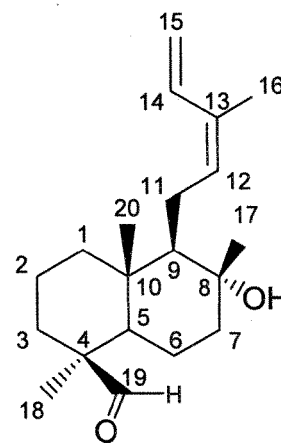
La présence des groupements aldéhydrique, alcool et alcénique révélé par l'analyse du spectre infrarouge, est apparente en RMN ^{13}C . Les signaux à δ_{C} 205,6, 73,9 et 133,2, 131,5, 133,5, 114,3 ppm en sont respectivement responsables. De plus, le couplage des

protons H-14 (δ 6,85 ppm) et H-15 (δ 5,13 et 5,21 ppm) en RMN ^1H suggère une structure isoprène observée en infrarouge, ce que corroborent également les corrélations HMBC du H-12 (δ 5,49 ppm) avec C-14 (δ 133,5 ppm) et C-16 (δ 20,1 ppm). Quant au Me-16 de la fonction isoprène, sa position d'attache est suggérée par une corrélation avec le C-13 (δ 131,5 ppm). De plus, le point d'ancrage du système isoprène en C-9 est appuyé par la corrélation HMBC entre, d'une part, H-9 (δ 1,36 ppm) et C-12 (δ 133,2 ppm) et, d'autre part, entre H-11 (δ 2,19 et 2,42 ppm) et C-8, C-9 ainsi que C-10 (δ 73,9, 60,9 et 39,3 ppm).

Les positions des méthyles 17 (δ 1,22 ppm) et 20 (δ 0,71 ppm) peuvent être démontré sur le spectre HMBC grâce à une corrélation commune avec C-9 (δ 60,9 ppm) et des corrélations propres entre Me-17 et C-8 puis C-7 (δ 44,0 ppm), de même qu'entre Me-20 et C-5 (δ 56,6 ppm), C-10 et C-1 (δ 39,6 ppm). Quant à l'aldéhyde (H-19), ce dernier corrèle avec les carbones 3, 4, 5 et 18 (δ 34,3, 48,5, 56,6 et 24,4 ppm), tandis que le Me-18 (δ 1,02 ppm) corrèle avec les carbones 3, 4, 5 et 19 (δ 205,6 ppm). Ainsi, l'analyse spectrale nous permet de déduire que l'aldéhyde est positionné sur le même carbone que le Me-18. Finalement, l'étude du spectre NOESY a permis de déterminer la position relative des groupements dans l'espace du produit **2**. Nous avons observé un couplage NOESY significatif entre le CHO-19, le Me-17 et le Me-20. Un couplage semblable est visible entre le H-11 et le Me-20. Pour ce qui est de l'insaturation en C-12 de la chaîne isoprène, sa géométrie *cis* a été déterminée par la corrélation entre le Me-16 (δ 1,80 ppm) et le H-12. La structure du produit **2** a été déterminée comme étant le 8 α -hydroxy-12Z,14-labdadiène-19-al. À notre connaissance, ce composé n'a jamais été rapporté dans la littérature.

Tableau 7. Analyse du spectre RMN¹H et ¹³C du produit **2** (CDCl₃)

Position	δ ¹ H [§] (mult., J (Hz))	δ ¹³ C [§]	COSY	HMBC
1	1,00 (m); 1,74 (m)	39,7 t	2	
2	1,48 (m); 1,62 (m)	18,6 t	1, 3	
3	1,03 (m); 2,12 (m)	34,3 t	2	
4	-	48,5 s		
5	1,30 (dd, 12,3; 2,0)	56,6 d	6	4, 19, 20
6	1,63 (m), 1,96 (m)	20,1 t	5	
7	1,45 (m), 1,93 (m)	44,0 t		
8	-	73,9 s		
9	1,36 (dd, 6,4; 4,5)	60,9 d	11	8, 12, 17, 20
10	-	39,3 s		
11	2,19 (m), 2,43 (m)	23,5 t	12	8, 9, 10, 12, 13
12	5,49 (br t, 7,6)	133,2 d	11	14, 16
13	-	131,5 s		
14	6,85 (dd, 17,8; 10,7)	133,5 d	15	12, 13, 16
15 ^Z	5,13 (br d, 10,8)	114,3 t	14	13, 14
15 ^E	5,21 (br d, 17,3)		14	13
16	1,80 (s)	20,1 q		13
17	1,22 (s)	24,7 q		8, 9
18	1,02 (s)	24,4 q		3, 5, 19
19	9,73 (s)	205,6 d		3, 4
20	0,71 (s)	14,5 q		9



§Déplacements chimiques exprimés en ppm

3.3.3 Identification du *cis*-19-hydroxyabienol (3)

3.3.3.1 Propriétés physiques

Le produit **3** est sous la forme de fins cristaux blancs ayant un point de fusion entre 110-113°C. Le pouvoir rotatoire spécifique du produit **3** est de $[\alpha]_D^{25} = -17^\circ$ ($c = 0,5$ CHCl₃). Les valeurs d'indice de rotation et de point de fusion du produit **3** n'ont jamais été rapportées dans la littérature.

3.3.3.2 Spectroscopie infrarouge

Tableau 8. Analyse du spectre infrarouge du produit **3**

Bande (cm ⁻¹)	Groupement fonctionnel
3488-3228	Élongation O-H
2921-2873	Élongation C-H
1643	Élongation -C=C-C=C-
1468-1388	Déformation asymétrique et symétrique C-H alcénique
1160-1014	Élongation C-O
933-899	Balancement C-H alcénique

Le spectre infrarouge du produit **3** (Tableau 8 et Annexe 3) est caractérisé par la présence de bandes d'absorption de fonctions alcools à 3488-3228 cm⁻¹ et à 1160 cm⁻¹ et 1014 cm⁻¹. Alors que les bandes à 1643 cm⁻¹, 1468-1388 cm⁻¹ et 930-900 cm⁻¹ sont caractéristiques des groupements vinyliques [51].

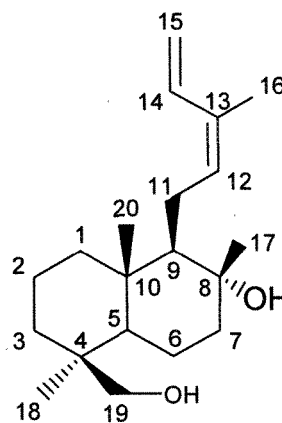
3.3.3.3 Spectroscopie de masse

La formule moléculaire du produit **3** a été déterminée à l'aide de la spectrométrie de masse à haute résolution, utilisant l'impact électronique comme mode d'ionisation. Un pic moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 329,2455 a été obtenu correspondant à la formule moléculaire $C_{20}H_{34}O_2$.

3.3.3.4 Résonance magnétique nucléaire

Tableau 9. Analyse RMN¹H et ¹³C du produit **3** (CDCl₃)

Position	δ ¹ H (mult., J(Hz))	δ ¹³ C
1	0,99 (m), 1,71 (m)	40,3 t
2	1,44 (m), 1,55 (m)	18,3 t
3	0,96 (m), 1,77 (m)	35,6 t
4	-	38,7 s
5	1,11 (dd, 12,3 ; 2,0)	56,8 d
6	1,30 (m), 1,74 (m)	20,6 t
7	1,45 (m), 1,85 (dt, 12,1 ; 3,0)	44,4 t
8	-	74,3 s
9	1,33 (m)	62,3 d
10	-	38,9 s
11	2,20 (m) ; 2,43 (m)	23,4 t
12	5,49 (t, 7,4)	133,7 d



Suite du tableau 9 intitulé : Analyse RMN¹H et ¹³C du produit **3** (CDCl₃)

Position	δ ¹ H (mult., J(Hz))	δ ¹³ C
13	-	131,1 s
14	6,92 (dd, 17,2; 10,6)	133,6 d
15Z	5,12 (br d, 10,9)	114,1 t
15E	5,21 (br d, 17,2)	
16	1,80 (s)	20,1 q
17	1,18 (s)	24,5 q
18	0,98 (s)	27,2 q
19	3,44 (d, 11,0);	65,5 t
	3,69 (d, 11,0)	
20	0,83 (s)	16,1 q

L'intégration du spectre RMN ¹H du produit **3** (tableau 9 et annexe 3) indique que la molécule est constituée de 32 protons et le spectre RMN ¹³C indique la présence de 20 carbones. L'analyse des spectres RMN ¹H, ¹³C et DEPT révèle la présence de quatre méthyle, huit méthylènes incluant un double lien terminal et un alcool primaire, quatre groupements méthynes incluant deux groupes oléfiniques et quatre carbones quaternaires incluant un groupe oléfinique et un groupe hydroxyle. Le produit **3** est très similaire à un labdane diterpénique déjà décrit dans la littérature [52]. L'analyse du spectre COSY montre un couplage entre les deux H-15 (δ 5,21 ; 5,12 ppm) et le H-14 (δ 6,88 ppm) suggérant que le double lien terminal monosubstitué fait partie d'une chaîne latérale. De plus, l'analyse du spectre HMBC montre un couplage entre H-14 et C-12 (δ 133,7 ppm), C-13 (δ 131,1 ppm),

C-16 (δ 20,1 ppm) ce qui indique que les deux doubles liens sont conjugués et que le groupe méthyle est attaché à C-13. L'attachement de la chaîne latérale en C-9 est confirmé par le spectre COSY qui montre un couplage entre H-11 (δ 2,20 ; 2,43 ppm) et H-9 (δ 1,33 ppm). L'analyse du spectre HMBC permet également d'observer des couplages entre H-17 (δ 1,18 ppm) et C-7 (δ 44,4 ppm), C-8 (δ 74,3 ppm), C-9 (δ 62,3 ppm) indiquant qu'un alcool tertiaire est attaché au même carbone que le méthyle en C-8. Le couplage entre H-18 (δ 0,98 ppm) et C-3 (δ 35,6 ppm), C-4 (δ 38,7 ppm), C-5 (δ 56,8 ppm), C-19 (δ 65,5 ppm) suggère que l'alcool est lié au carbone C-4. L'étude du spectre NOESY 2D a permis de déterminer la position relative des groupements dans l'espace du produit **3**. Le couplage entre H-16 (δ 1,80 ppm) et H-12 (δ 5,49 ppm) indique que la configuration du double lien intérieur est *cis*. De plus, le couplage entre H-11 et H-17, H-20 (δ 0,83 ppm) montre que tous les groupements sont positionnés du même côté de la molécule. Finalement, le couplage entre H-19 (δ 3,44 ; 3,69 ppm) et H-20 confirme que la configuration β de l'alcool primaire. La structure du produit **3** a été déterminée comme étant le *cis*-19-hydroxyabienol. À notre connaissance, ce composé n'a jamais été rapporté dans la littérature.

3.3.4 Identification du 3-methoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (rhapontigénine) (4)

3.3.4.1 Propriétés physiques

Le produit **4** obtenu sous forme de cristaux violacés était visible à l'UV sur les CCM. Ces cristaux présentaient un point de fusion de 195-196 °C. Ce résultat correspond au point de fusion de la rhapontigénine dans la littérature (196-197 °C) [53].

3.3.4.2 Spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge du produit **4** (Tableau 10 et Annexe 4) montre une bande d'absorption intense à 3578-3288 cm^{-1} . Celles-ci sont caractéristiques des fonctions alcools. La présence d'un groupement aromatique est révélée par une bande d'absorption caractéristique à 1601 cm^{-1} causée par l'élongation C=C d'un cycle due au C-H aromatique. Finalement, la bande d'absorption à 1264 cm^{-1} suggère la présence d'une fonction éther.

Tableau 10. Analyse du spectre infrarouge du produit **4**

Bande (cm^{-1})	Groupement fonctionnel
3578-3288	Élongation O-H
3054	Élongation C-H aromatique
1601	Élongation C=C aromatique
1264	Élongation -C-O-C-

3.3.4.3 Spectroscopie de masse

La spectrométrie de masse à haute résolution (impact électronique) a permis d'observer un ion moléculaire ayant un rapport m/z de 258,0900 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui correspond à la formule moléculaire de $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

3.3.4.4 Résonance magnétique nucléaire

L'intégration des pics sur le spectre RMN ^1H (tableau 11 et annexe 4) indique que la molécule est constituée d'au moins 11 protons. La présence marquée des pics entre 6.0 et 7.0 ppm signifie que la molécule est essentiellement aromatique. Le pic à 3,87 ppm, intégrant pour trois protons, appuie l'hypothèse d'un groupement éther.

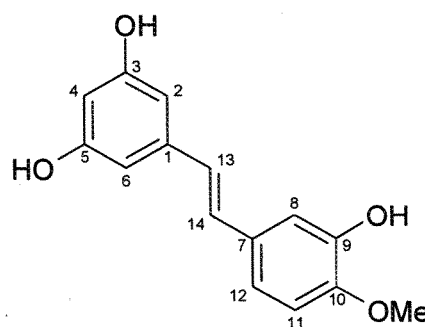
La corrélation observable sur le spectre HSQC permet d'élucider la structure aromatique de la molécule. La présence d'un système typique ABX (δ 6,89 ppm, 1H, d, $J=8,1$; δ 6,94 ppm, 1H, dd, $J=2,2$ et 8,1; δ 7,00 ppm, 1H, d, $J=2,2$) permet l'assignation de l'un des noyaux aromatiques 1,3,4-trisubstitués, tandis que le système AX^2 (δ 6,17 ppm, 1H, d, $J=2,2$; δ 6,45 ppm, 2H, $J=2,2$) observé est attribuable à un noyau aromatique 1,3,5-trisubstitués.

Il aussi intéressant de remarquer la présence de deux doublets à 6,78 et 6,91 ppm, qui intègrent chacun pour un proton. Chaque doublet a une constante de couplage élevée, soit environ 16 Hz. Une telle constante de couplage suggère la présence d'un alcène *trans*.

L'analyse des données spectrales et leur comparaison avec les données spectrales disponibles dans la littérature [53, 54], ont permis de déterminer la structure du produit 4 comme étant le 3-methoxy-3,3',5'-trihydroxystilbene (rhapontigénine).

Tableau 11. Analyse RMN¹H et ¹³C du produit 4 (CD₃OD)

Position ^o	δ ¹ H (mult., J(Hz))	δ ¹³ C
1	-	141,3 s
2, 6	6,45 (d, 2,2)	106,0 d
3, 5	-	159,9 s
4	6,17 (d, 2,2)	103,0 d
7	-	132,4 s
8	7,00 (d, 2,2)	113,8 d
9	-	147,9 s
10	-	149,2 s
11	6,89 (d, 8,1)	112,9 d
12	6,94 (dd, 2,2, 8,1)	120,2 d
13	6,91 (d, 16,1)	129,6 d
14	6,78 (d, 16,8)	128,1 d
Me	3,87	56,5 q



3.4 Confirmation de la similitude structurale entre les produits 2 et 3.

La structure des produits 2 et 3 étant très similaire (voir structures moléculaires aux tableau 7 et 9), il était intéressant de confirmer cette similitude par oxydation de la fonction alcool du produit 3 avec le pyridinium dichromate afin d'obtenir l'aldehyde correspondant.

Le spectre du composé synthétique est parfaitement superposable avec de l'analogue naturel (produit 2).

3.5 Évaluation *in vitro* de la cytotoxicité des produits 1-4 isolés de l'écorce de *L. laricina*.

La cytotoxicité des produits 1-4 a été évaluée *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses humaines du poumon (A-549) et du côlon (DLD-1) ainsi que sur une lignée de cellules saines humaines (WS1). La carmustine, le chlorambucil et le carboplatine ont été utilisés comme témoin positif. Les résultats présentés dans le tableau 12 sont exprimés en concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire (IC_{50}). Les produits 1 et 2 sont modérément actifs avec une IC_{50} respective de $(59 \pm 4) \mu\text{M}$ et $(44 \pm 5) \mu\text{M}$ pour A-549 et de $(50 \pm 2) \mu\text{M}$ et $(50 \pm 20) \mu\text{M}$ pour DLD-1. Cependant, les deux composés sont aussi cytotoxiques envers les cellules saines, WS1. Le produit 3 possède une activité cytotoxique significative contre les cellules cancéreuses du côlon DLD-1 avec une IC_{50} de $(37 \pm 3) \mu\text{M}$ alors qu'il est inactif contre les cellules cancéreuses du poumon A-549 et les cellules normales WS1 ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$). Finalement, le produit 4 est inactif sur toutes les lignées cellulaires testées ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$). L'ensemble des résultats obtenus suggère que les produits 1, 2 et 3 pourraient être en partie responsables de l'activité anticancéreuse de l'extrait chloroformique de l'écorce de *L. laricina*.

Tableau 12. Cytotoxicité des produits 1-4 isolés de l'écorce de *L. laricina*.

Produits	IC ₅₀ (µM, n=3) ^a		
	A-549	DLD-1	WS-1
Carmustine	40 ± 10	50 ± 10	26 ± 4
Chlorambucil	11 ± 1 ^b	14 ± 4 ^b	40 ± 10
Carboplatin	63 ± 6	130 ± 20	n.d. ^b
(1)	59 ± 4	50 ± 2	62 ± 12
(2)	44 ± 5	46 ± 17	32 ± 1
(3)	> 200	37 ± 3 ^b	> 200
(4)	> 200	> 200	> 200

^aConcentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire

^bSignificativement plus sensible que les fibroblastes (WS1);
p ≤ 0.05, student-test.

^cnon déterminé

CHAPITRE 4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude d'un extrait au chloroforme de l'écorce de *Larix laricina* avait démontré une inhibition significative de la croissance des cellules cancéreuses. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié la composition chimique de l'extrait au chloroforme d'écorce de *Larix laricina* et évalué la cytotoxicité des composés isolés sur des lignées de cellules cancéreuses. L'extrait a d'abord été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice afin d'isoler les composés majoritaires. Quatre composés dominants ont été isolés et identifiés. Ces composés sont : le 19-acetoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène (**1**) ; le 19-oxo-8(S)-hydroxylabda-12(Z),14-dienal (**2**) ; le *cis*-19-hydroxyabienol (**3**) ; et la rhapontigénine (**4**). Les produits **2** et **3** sont de nouvelles structures qui n'avaient jamais été rapportées dans la littérature auparavant alors que les produits **1** et **4** sont deux composés connus que nous avons isolés pour la première fois dans l'écorce de *L. laricina*.

L'activité cytotoxique des quatre composés a été évaluée sur une lignée de cellule cancéreuse du poumon (A-549) et une lignée de cellule cancéreuse du côlon (DLD-1) ainsi que sur une lignée de cellules saines (WS-1). Les produits **1** et **2** inhibent significativement la croissance des cellules A-549, DLD-1 et WS-1 alors que le produit **4** est inactif. Le produit **3** est actif sur les cellules DLD-1 et inactif sur les cellules A-549 et WS-1. La sélectivité du produit **3** pour les cellules cancéreuses du côlon devra être confirmée sur d'autres lignées cellulaires du cancer du côlon. Il serait également intéressant de réaliser une étude de structure-activité avec différents analogues du produit **3**.

Des travaux supplémentaires visant à poursuivre l'étude de la composition chimique de l'écorce de *L. laricina* pourraient être entrepris. Ainsi, les fractions F1 et F5, qui ont été laissées de côté dans cette étude, pourraient présenter un potentiel d'étude phytochimique si ces dernières démontraient une activité *in vitro* intéressante.

CHAPITRE 5

PARTIE EXPÉRIMENTALE

5.1 Généralités

5.1.1 Solvants et réactifs

Les analyses HPLC ont été effectuées avec de l'acétonitrile de grade HPLC (EMD, Canada) et de l'eau distillée et déminéralisée. L'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'hexane, le méthanol et le toluène employés pour l'extraction et la séparation des composés étaient de grade réactif (Anachemia, Canada). Le gel de silice (40-63 μm) utilisé était de grade UltraPure (Silicycle, Canada) et les plaques de chromatographie sur couche mince (aluminium ou verre, Silicycle, Canada) étaient recouvertes d'un film de 250 μm de gel de silice (particules de 40-63 μm avec indicateur F-254). Les systèmes de solvants utilisés pour l'élution des CCM étaient CHCl_3 -MeOH (20:1) ou CHCl_3 -EtOAc (40:1). Les produits séparés sur CCM ont été révélés en chauffant les plaques à 110°C durant 3 à 5 minutes préalablement traitées avec une solution éthanolique 20 % de H_2SO_4 . Ces derniers ont donc pu être observés à la lumière du jour et à l'aide d'une lampe ultraviolette (254 et 365 nm).

5.1.2 Appareil pour mesurer le point de fusion

Le point de fusion des solides isolés a été mesuré dans des capillaires avec un appareil de marque Gallenkamp.

5.1.3 Appareil pour mesurer l'indice de rotation

Un appareil Jasco DIP-360 digital équipé d'une cellule de 10 cm pouvant contenir 100 μ L de solution, a permis de mesurer l'indice de rotation en utilisant la raie D du sodium.

5.1.4 Appareil de spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges ont été effectués sur un appareil de marque Perkin, Spectrum One en utilisant soit des pastilles de KBr, à raison d'une concentration de 4 % en masse de produit, soit un film d'huile sur des pastilles de NaCl.

5.1.5 Appareil de résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés à 19°C sur un appareil de type Bruker Avance 400 d'une fréquence de 400,13 MHz pour le noyau ^1H et de 100,61 MHz pour le noyau ^{13}C . Cet appareil était muni d'une sonde QNP de 5 mm permettant des gradients de champ magnétique selon z. Les déplacements chimiques ont été reportés en ppm en utilisant, comme référence, le pic de solvant résiduel [55]. L'élucidation complète des structures moléculaires a été basée sur les expériences RMN ^1H , ^{13}C , DEPT-135 et les expériences 2-D COSY, HSQC, HMBC.

5.1.6 Appareil HPLC/MS

Les chromatogrammes HPLC/MS ont été obtenus à partir d'un appareil HPLC-DAD-MS Agilent 1100 series. Ce système était équipé de différents dispositifs : un injecteur automatique pour les échantillons, un dégazeur, une pompe et un compartiment thermorégulé pour les colonnes. L'appareil était aussi muni d'un détecteur à photodiodes (DAD) et d'un détecteur MS (model VL) avec une source à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Le gaz porteur utilisé était de l'azote.

La séparation par chromatographie a été réalisée sur une colonne Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4,6 mm x 150 mm x 5 µm). Les labdanes ont été purifiés en utilisant une élution isocratique eau -Acétonitrile (45/55) contenant 0,5% d'acide formique. La rhapontigénine, quant à elle, a été purifiée à l'aide d'un gradient d'élution de 50 % de MeOH dans l'eau pour obtenir 100 % de MeOH en 30 minutes. La détection dans l'ultraviolet a été réalisée en utilisant une longueur d'onde de 254 nm avec une largeur de bande de 50 nm. Le système MS a été opéré dans un mode positif avec un voltage de fragmentation de 80 volts. Un intervalle de masse m/z entre 100 à 700 a ainsi été détecté. Les paramètres APCI ont été ajustés pour un voltage capillaire de 3000 V et un courant corona de 4 µA. L'azote a été utilisé comme gaz déshydratant à raison de 4 L/min. L'étape de vaporisation s'est effectuée à 300°C avec une pression de nébuliseur de 275 kPa.

5.1.7 Appareil HPLC semi-préparatif

L'appareil HPLC semi-préparatif qui a été utilisé était de marque Agilent 1100 LC équipé d'un détecteur ultraviolet de type Agilent G1365B. Une colonne Zorbax ODS-C₁₈ (21,2 mm x 250 mm x 7 µm) à un débit de 17 mL/minute a été utilisée pour la séparation. Ce dispositif était équipé d'un collecteur automatique de fractions (Agilent G1365A).

5.1.8 Appareil de spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse à haute résolution a été menée par le laboratoire de spectroscopie de masse de l'Université de Toronto. Leur équipement consistait en un appareil de type Biosystem utilisant un détecteur QSTAR XL. La détection a été faite à l'aide du système TOF (*time of flight*), et l'ionisation de l'échantillon, par l'intermédiaire d'un électropulvérisateur.

5.2 Matériel végétal

Les troncs de *Larix laricina* (Duroi) ont été récoltés près du Lac Girard, à ville Saguenay. Ils ont par la suite été identifiés par M. Patrick Nadeau. Un spécimen (No 0493197) a aussi été déposé à l'herbarium Louis-Marie de l'Université Laval. L'écorce a ensuite été séchée dans une étuve à 36 °C, puis broyée en poudre. Cette poudre a été conservée au congélateur (-18 °C) avant de réaliser l'extraction.

5.3 Extraction et isolation

L'écorce broyée et séchée (2 kg) de *L. laricina* a d'abord été extraite avec du chloroforme (15 L) à reflux. Après l'évaporation sous pression réduite du solvant, un résidu de couleur verte (221,38 g, 11,1 %) a été obtenu. Une portion de ce dernier (105,25 g) a été chromatographiée sur gel de silice en phase normale (2 kg). L'éluant n-hexane-EtOAc (10:1) a permis d'obtenir la fraction 1 (43,36 g) et, d'éliminer les composés peu polaires de l'extrait. L'élution avec le n-hexane-EtOAc (2:1) a permis d'obtenir la fraction 2 (15,58 g) et la fraction 3 (13,11 g). De la même manière, la fraction 4 (4,32 g) a été produite en éluant avec un système de solvants identiques dans des proportions de 50% (v/v). La fraction 5 est le résultat de l'élution avec l'EtOAc pur.

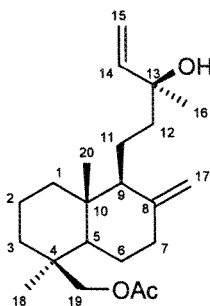
La fraction 2 a ensuite été chromatographiée sur gel de silice (250 g) et éluee avec un système CHCl₃-EtOAc (40/1). Par ce procédé, le 19-acétoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène (**1**) (217,3 mg) et le 19-oxo-8R-hydroxylabda-12Z,14-dienal (**2**) (109,8 mg) ont été obtenus. Le produit **2** présentait des impuretés visibles sur CCM. Il a donc finalement été purifié sur gel de silice en phase inverse (15 g) en utilisant un éluant MeOH-H₂O (4 : 1) pour donner le 19-oxo-8R-hydroxylabda-12Z,14-dienal (**2**) pur (9,8 mg, éluats 25 à 28; pureté HPLC ($t_R = 10,75 \text{ min.}$) : 94,1%).

La fraction 3, quant à elle, a été chromatographiée sur gel de silice (200 g) à l'aide d'un mélange de solvants CHCl₃-MeOH (20 : 1). Dans ces conditions, une huile jaune (1,96 g) a été obtenue. De cette huile ont été recueillis 417,4 mg du 18-hydroxyabienol (**3**)

(Pureté HPLC ($t_R = 7,90 \text{ min.}$) : 99,8 %), par recristallisation dans le chloroforme à température ambiante.

La fraction 4 a été chromatographiée sur gel de silice (200 g). Une élution isocratique $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (20:1) a permis l'isolation de la rhapontigénine (4) (237,5 mg). La séparation par HPLC semi-préparatif s'est avérée nécessaire afin de purifier la rhapontigénine (4) (41 mg ; pureté HPLC ($t_R = 15,17 \text{ min.}$) : > 95,0%).

19-acétoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène (1) :



Huile jaune, $[\alpha]_D^{25} +12^\circ$ ($c = 0,3 \text{ CHCl}_3$), R_f 0,69 (SiO_2 , $\text{CHCl}_3\text{-EtOAc}$ (40:1)).

IR (film) ν_{max} (cm^{-1}) : 3 426, 2 933-2 846, 1 733, 1 643, 1 450-1 370, 1 243, 1 030, 900-890.

$\text{RMN}^1\text{H}^\dagger$ (chloroforme-d) : δ (ppm) 0,68 (s, 3H, **20**), 0,95 (s, 3H, **18**), 1,01 (m, 1H, **3**), 1,05 (m, 1H, **1**), 1,24 (m, 1H, **5**), 1,25 (m, 1H, **12**), 1,27 (s, 3H, **16**), 1,33 (m, 1H, **6**), 1,37 (m,

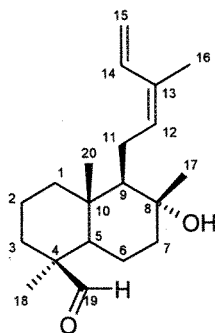
[†] L'assignation exacte des signaux protons α et β sur les membres cyclohexane n'a pas été réalisée.

1H, **11**), 1,50 (m, 2H, **2**), 1,54 (m, 1H, **11**), 1,56 (m, 1H, **9**), 1,72 (m, 1H, **3**), 1,77 (m, 1H, **12**), 1,81 (m, 1H, **1**), 1,83 (m, 1H, **6**), 1,92 (td, 1H, 4,5 Hz, 12,6 Hz, **7**), 2,03 (s, 3H, **22**), 2,39 (ddd, 1H, 2,2 Hz, 3,8 Hz, 12,6 Hz, **7**), 4,21 (d, 1H, 11,0 Hz, **19**), 4,53 (br s, 1H, **17**), 4,80 (br s, 1H, **17**), 3,84 (d, 1H, 11,0 Hz, **19**), 5,05 (dd, 1H, 1,0 Hz, 10,8 Hz, **15**), 5,20 (dd, 1H, 1,0 Hz, 17,5 Hz, **15**), 5,90 (dd, 1H, 10,7 Hz, 17,0 Hz, **14**).

RMN¹³C (chloroforme-d) : δ (ppm) 15,4 (q, **20**), 17,9 (t, **11**), 19,1 (t, **2**), 21,2 (q, **22**), 24,6 (t, **6**), 27,7 (q, **18**), 27,8 (q, **16**), 36,4 (t, **3**), 37,4 (s, **4**), 38,7 (t, **7**), 38,9 (t, **1**), 39,9 (s, **10**), 41,4 (t, **12**), 56,4 (d, **5**), 57,4 (d, **9**), 66,9 (t, **19**), 73,7 (s, **13**), 107,1 (t, **17**), 111,8 (t, **15**), 145,4 (d, **14**), 148,0 (s, **8**), 171,5 (s, **21**).

MS-ESI-HR : m/z 371,2559 [M+Na]⁺, calculée pour C₂₂H₃₆O₃Na, 371,2562.

19-oxo-8R-hydroxylabda-12Z, 14-dienal (2) :



Cristaux blancs, $[\alpha]_D^{25} -35^\circ$ (c 0,2 CHCl₃), R_f 0,32 (SiO₂, toluène-EtOAc (85:15)).

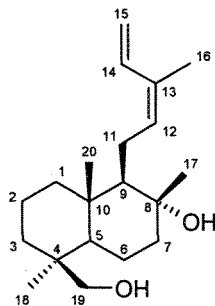
IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) : 3 426, 2 922-2 837, 1 716, 1 455, 1 385, 1 163-1 080, 753.

RMN¹H^{††} (chloroforme-d) : δ (ppm) 0,71 (s, 3H, **20**), 1,00 (m, 1H, **1**), 1,02 (s, 3H, **18**), 1,03 (m, 1H, **3**), 1,22 (s, 3H, **17**), 1,30 (dd, 1H, 2,0 Hz, 12,3 Hz, **5**), 1,36 (dd, 1H, 4,5 Hz, 6,4 Hz, **9**), 1,45 (m, 1H, **7**), 1,48 (m, 1H, **2**), 1,62 (m, 1H, **2**), 1,63 (m, 1H, **6**), 1,74 (m, 1H, **1**), 1,80 (s, 3H, **16**), 1,93 (m, 1H, **7**), 1,96 (m, 1H, **6**), 2,12 (m, 1H, **3**), 2,19 (m, 1H, **11**), 2,42 (m, 1H, **11**), 5,13 (br d, 1H, 10,5 Hz, **15_Z**), 5,21 (br d, 1H, 17,5 Hz, **15_E**), 5,49 (br t, 1H, 7,6 Hz, **12**), 6,85 (dd, 1H, 10,7 Hz, 17,3 Hz, **14**), 9,73 (s, 1H, **19**).

RMN¹³C (chloroforme-d) : δ (ppm) 14,5 (q, **20**), 18,6 (t, **2**), 20,0 (t, **6**), 20,1 (q, **16**), 23,5 (t, **11**), 24,4 (q, **18**), 24,7 (q, **17**), 34,3 (t, **3**), 39,3 (s, **10**), 39,6 (t, **1**), 44,0 (t, **7**), 48,5 (s, **4**), 56,6 (d, **5**), 60,9 (d, **9**), 73,9 (s, **8**), 114,3 (t, **15**), 131,5 (s, **13**), 133,2 (d, **12**), 133,5 (d, **14**), 205,6 (d, **19**).

MS (APCI, N₂) : m/z 287 [M - OH]⁺, 259 [M - OH - CHO]⁺, 223 [M - OH - C₅H₇]⁺.

Cis 19-hydroxyabienol (3) :



Cristaux incolores, $[\alpha]_D^{25} -17^{\circ}$ (c 0,5 CHCl₃), R_f 0,12 (SiO₂, toluène-EtOAc (85:15)).

[†] L'assignation exacte des signaux protons α et β sur les membres cyclohexane n'a pas été réalisée.

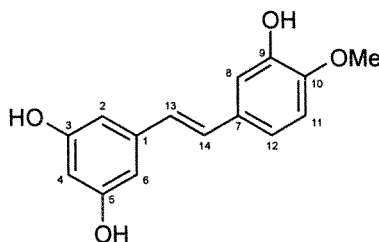
IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 3 488-3230, 2 920-2 873, 1 643, 1 468-1 430, 1 388, 1 160-1 014, 933-899.

RMN¹H[†] (chloroforme-d) : δ (ppm) 0,83 (s, 3H, **20**), 0,99 (m, 1H, **1**), 0,97 (m, 1H, **3**), 0,98 (s, 3H, **18**), 1,11 (dd, 1H, 2,0 Hz, 12,3 Hz, **5**), 1,18 (s, 3H, **17**), 1,33 (m, 1H, **9**), 1,30 (m, 1H, **6**), 1,44 (m, 1H, **2**), 1,40 (m, 1H, **7**), 1,55 (m, 1H, **2**), 1,77 (m, 1H, **3**), 1,74 (m, 1H, **6**), 1,79 (s, 3H, **16**), 1,71 (m, 1H, **1**), 1,86 (m, 1H, **7**), 2,20 (m, 1H, **11**), 2,43 (m, 1H, **11**), 3,44 (d, 1H, 11,0 Hz, **19**), 3,68 (d, 1H, 11,0 Hz, **19**), 5,12 (br d, 1H, 10,9 Hz, **15_Z**), 5,21 (br d, 1H, 17,2 Hz, **15_E**), 5,49 (t, 1H, 7,4 Hz, **12**), 6,88 (dd, 1H, 10,6 Hz, 17,2 Hz, **14**).

RMN¹³C (chloroforme-d) : δ (ppm) 16,1 (q, **20**), ,18,3 (t, **2**), 20,1 (q, **16**), 20,6 (t, **6**), ,24,5 (q, **17**), ,23,4 (t, **11**), 27,2 (q, **18**), ,40,3 (t, **1**), ,38,7 (s, **4**), ,38,9 (s, **10**), ,38,7 (t, **3**), 44,4, (t, **7**), 56,8, (d, **5**), 62,3, (d, **9**), 65,5 (t, **19**), 74,3 (s, **8**), 11,4,1 (t, **15**), ,131,1 (s, **13**), ,133,6 (d, **14**), ,133,7 (d, **12**).

MS-ESI-HR : m/z 329,2455 [M+Na]⁺, calculée pour C₂₀H₃₄O₂Na, 329,2457.

Rhapontigénine (**4**) :



[†] L'assignation exacte des signaux protons α et β sur les membres cyclohexane n'a pas été réalisée.

Cristaux violacés, point de fusion : 195-196°C , R_f 0,84 (C₁₈, MeOH-H₂O (9:1)).

IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 3 578, 3 288, 3 054, 2 980, 2 877, 1 601, 1 493, 1 264.

RMN¹H (chloroforme-d) : δ (ppm) 3,87 (s, 3H, **Me**), 6,17 (d, 1H, 2,2 Hz, **4**), 6,45 (d, 2H, 2,2 Hz, **2 & 6**), 6,78 (d, 1H, 16,8 Hz, **14**), 6,89 (d, 1H, 8,1 Hz, **11**), 6,91 (d, 1H, 16,1 Hz, **13**), 6,94 (dd, 1H, 2,2 Hz, 8,1 Hz, **12**), 7,01 (d 1H, 2,2 Hz, **8**).

RMN¹³C (chloroforme-d) : δ (ppm) 56,5 (q, **Me**), 103,0 (d, **4**), 106,0 (d, **2 & 6**), 112,9 (d, **11**), 113,8 (d, **8**), 120,2 (d, **12**), 128,1 (d, **14**), 129,6 (d, **13**), 132,4 (s, **7**), 141,3 (s, **1**), 147,9 (s, **9**), 149,2 (s, **10**), 159,9 (s, **3 & 5**).

MS-ESI-HR : m/z 258,0900 [M]⁺, calculée pour C₁₅H₁₄O₄, 258,0892.

5.4 Synthèse du 19-oxo-8R-hydroxylabda-12(Z),14-dienal (**2**) à partir du *cis* 19-hydroxyabienol (**3**)

Le dichromate de pyridinium (50 mg, 0,28 mmole) a été solubilisé dans le dichlorométhane et cette solution a été ajoutée, goutte à goutte, à une solution de *cis* 19-hydroxyabienol (**3**) (40 mg, 0,13 mmole). Le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant huit heures et le résidu de chrome réduit a été filtré sur Florisil. L'évaporation sous pression réduite du solvant a permis d'obtenir une huile incolore. Cette huile a par la suite été chromatographiée sur gel de silice en utilisant le mélange n-hexane-EtOAc (3 : 1) comme éluant. Le 19-oxo-8R-hydroxylabda-12(Z),14-dienal (**2**) (19,1 mg) a

ainsi été obtenu. Les spectres RMN du produit synthétique ont été comparés directement avec ceux du produit naturel isolé.

5.5 Évaluation *in vitro* de l'activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse *in vitro* de l'extrait et de ses constituants a été évaluée sur les cellules cancéreuses humaines du poumon A-549 (ATCC #CCL-185) et sur les cellules cancéreuses humaines du côlon DLD-1 (ATCC #CCL-221). Les cellules cancéreuses proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, États-Unis). Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture contenant 10% de sérum fœtal de veau (Hyclone, Logan, États-Unis), des vitamines (1X), du pyruvate de sodium (1X), des acides aminés non-essentiels (1X), 100 unités de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Mediatech Cellgro®). Ces dernières ont été incubées dans une atmosphère à humidité contrôlée à 37 °C et à 5% de CO₂ pour leur croissance.

Pour les tests *in vitro*, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (Costar Corning Inc.) à raison de 5×10^3 cellules par puit. Chaque puit contenait 100 µL de médium de culture. Les plaques ont été laissées 16 heures à l'incubateur pour permettre aux cellules d'adhérer aux puits avant le traitement. Par la suite, 100 µL de molécules isolées ou d'extrait, préalablement solubilisés dans l'éthanol absolu, ont été ajoutés à différentes concentrations. La concentration finale en éthanol dans tous les puits de la plaque correspondait à 0,5% (v/v). Le contrôle positif utilisé lors des expérimentations était le

médium de culture contenant 0,5 % d'éthanol absolu. Les cellules ont été incubées durant 48 heures avant que la cytotoxicité des composés et de l'extrait ne soit mesurée.

La cytotoxicité a été évaluée en utilisant le test de réduction de la résazurine [56]. La fluorescence a été mesurée par un Fluoroscanner Ascent F1 contenant un lecteur de plaques automatisé. Une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm ont été utilisées pour lire les plaques. La fluorescence était proportionnelle à la quantité de cellules. La cytotoxicité est exprimée en concentration qui inhibe 50% de la croissance cellulaire (IC_{50}) par comparaison aux cellules non traitées. Chaque valeur d' IC_{50} correspond à la moyenne résultant d'un triplicat.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Rapport annuel de gestion 2003-2004, ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs, Québec, 73 pages.
- [2] Ressources et industries forestière - Portrait statistique, édition 2007, ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs, 506 pages.
- [3] D. Moerman, Native American ethnobotany, 1998, Timber Press, 927 pages.
- [4] J.W. Herrick, Iroquois medicinal botany, 1994, Syracuse University Press, 284 pages.
- [5] A.R. Hutchens, Indian herbology of North America, 1991, Shambhala, Boston, 754 pages.
- [6] S. Foster, J. A. Duke, A field guide to medicinal plants, 1986, Houghton Mifflin Company, Boston, 424 pages.
- [7] R. Frank Chandler, L. Freeman, S. N. Hooper, Herbal remedies of the maritime indians, *J. Ethnopharm.*, 1979, **1**, 49.
- [8] M. J. Black, Algonquin ethnobotany : An interpretation of aboriginal adaptation in south westernm Quebec, 1980, Ottawa, Édition National Museums of Canada, 266 pages.
- [9] A. Harvey, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, *Drug discovery today, Review*, 2000, **5**, 294.
- [10] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 1022.
- [11] Mark S. Butler, Naturel products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials, *Nat. Prod. Rep.*, 2005, **22**, 162.

- [12] Yue-Zhong Shu, Recent natural products based drug development : A pharmaceutical industry perspective, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 1053.
- [13] R. Bentley, Mycophenolic acid: A one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 3801.
- [14] J. Grünewald, S.A. Sieber, C. Mahlert, U. Linne, M. A. Marahiel, Synthesis and derivatization of daptomycin: A chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotic, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 17025.
- [15] M. S. Butler, The role of natural product chemistry in drug discovery, *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, 2141.
- [16] G. P. Gunawardana, U. Premachandran, N. S. Burres, D. N. Whittern, R. Henry, S. Spanton, J. B. MacAlpine, Isolation of 9-Dihydro-13-acetylbaccatin III from *Taxus canadensis*, *J. Nat. Prod.*, 1992, **55**, 1686.
- [17] D. G. I. Kingston, The shape of things to come: Structural and synthetic studies of taxol and related compounds, *Phytochemistry*, 2006,
- [18] V.L. Seminov, H. Zhang, M. Sun, M. Lascoux, Conflicting phylogenies of *Larix* (Pinaceae) based on cytoplasmic and nuclear DNA, *Mol. Phylogen. Evol.*, 2003, **27**, 173.
- [19] E. Von Rudloff, The volatile twig and leaf oil terpene compositions of three western North American larch. *Larix laricina*, *Larix occidentalis*, and *Larix Lyalli*, *J. Nat. Prod.*, 1987, **50**(2), 317.
- [20] Frère Marie-Victorin, Flore Laurentienne, 3^{ième} édition, 1995, Presses de l'Université de Montréal, 917 pages.

- [21] M.S. Lapp, E. von Rudloff, Chemosystematic studies in the genus Pinus. IV. Leaf oil composition and geographic variation in jack pine of eastern North America, *Can. J. Bot.*, 1982, **60**, 2762.
- [22] L.E. Tyrell, R.E.J. Boerner, Larix laricina and Picea mariana: relationships among leaf life-span, foliar nutrient patterns, nutrient conservation, and growth efficiency, *Can. J. Bot.*, 1987, **65**, 1570.
- [23] D. Clément, L'ethnobotanique montagnaise de Mingan, 1990, Centre d'études nordiques, Presses de l'Université Laval, 108 pages.
- [24] J. Lauriault, Guide d'identification des arbres du Canada, 1987, Édition Marcel Boquet inc., LaPrairie, 552 pages.
- [25] W. H., Mechling, The Malecite Indians, *Anthropologica*, 1959, **8**, 239.
- [26] R. F. Chandler, L. Freeman, S. N. Hooper, Herbal remedies of the maritime Indians, *J. Ethnopharm.*, 1979, **1**, 49.
- [27] N. Gierlinger, D. Jacques, M. Schwanninger, R. Wimmer, L. E. Pâques, Heartwood extratives and lignin content of larch species (Larix sp.) and relationship to brown-rot decay-resistance, *Tree*, 2004, **18**, 230.
- [28] S. Mongrand, A. Badoc, B. Patouille, C. Lacomblez, M. Chavent, C. Cassagne, J.-J. Bessoule, Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition, *Phytochemistry*, 2001, **58**, 101.
- [29] M.J. Hodson, A.G. Sangster, Aluminium/silicon interaction in conifers, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **76**, 89.

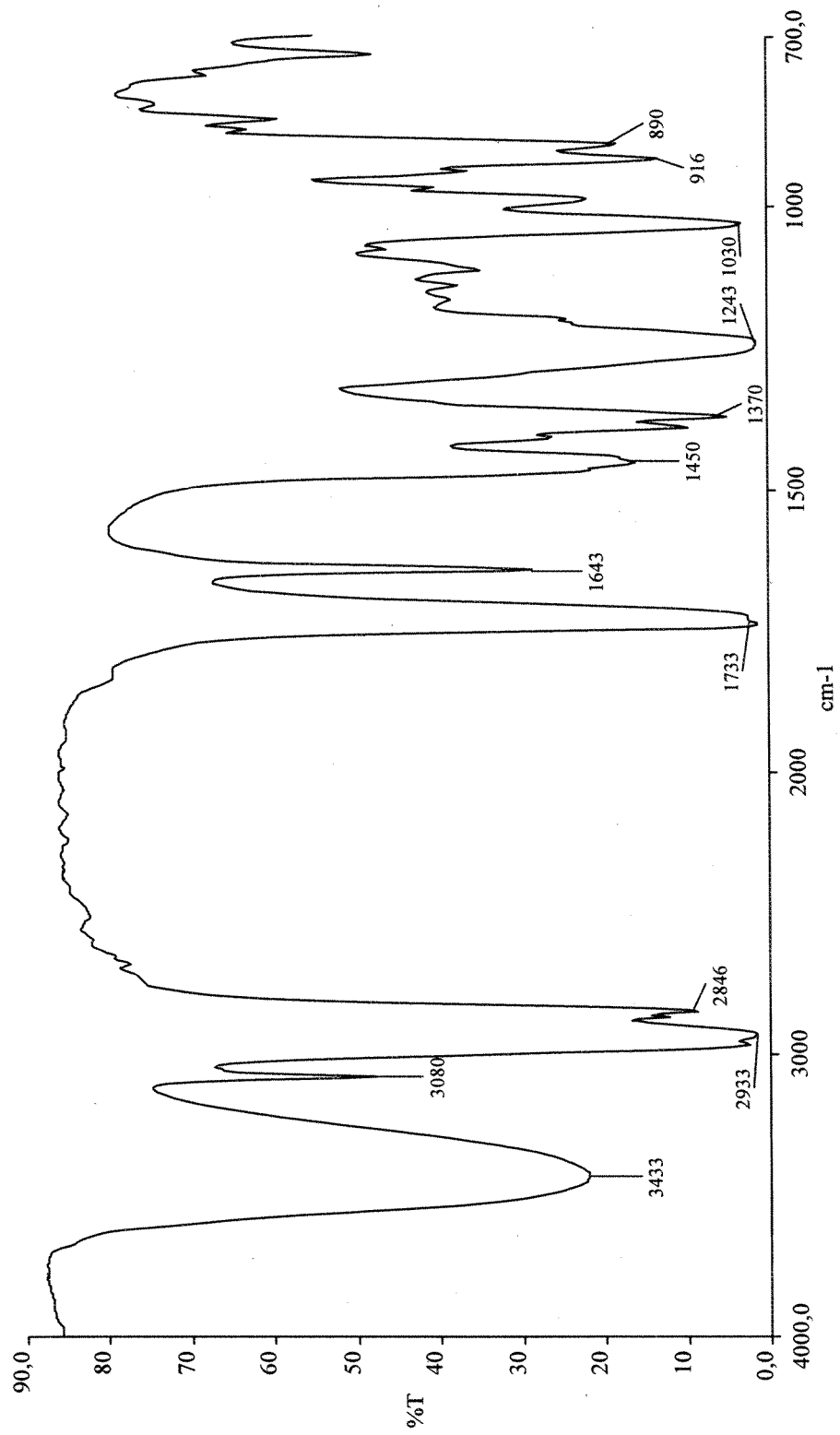
- [30] J.S. Powell, K.F. Raffa, Sources of variation in concentration and composition of foliar monoterpenes in Tamarack seedling: role of nutriment availability, time of season, and plant architecture, *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25**, 1771.
- [31] Éditorial, Larch Arabinogalactan, *Altern. Med. Rev.*, 2000, **5**, 463.
- [32] J. E. Dewitt, Method of isolating arabinogalactan from larch, 1990-08-21, Patent number : US4950751.
- [33] F. Masaaki, S. Zatsumi, K. Koichi, I. Yoshifumi, K. Kazuaki, Arabinogalactan-Containing Liquid Composition and Its Production, 1990-08-28, Patent number: JP 221 5353.
- [34] J.H. Prescott, P. Enriquez, C. Jung, E. Menz, E.V. Groman, Larch arabinogalactan for hepatic drug delivery: isolation and characterization of a 9 kDa arabinogalactan fragment, *Carbohydr. Res.*, 1995, **278**, 113.
- [35] L.S. Kim, R.F. Waters, P.M. Burkholder, Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Altern. Med. Rev.*, 2002, **7**, 138.
- [36] R. Gonda, M. Tomoda, N. Ohara, K. Takada, Arabinogalactan core structure and immunological activities of ukonan C, an acidic polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*, *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, **16**, 235.
- [37] P.L. Owen, T. Johns, Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout, *J. Ethnopharmacol.*, 1999, **64**, 149.
- [38] G.J. Niemann, R. Bekooy, Flavanoid constituents from *Larix* needles, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 893.

- [39] J.S. Mills, Diterpenes of Larix oleoresins, *Phytochemistry*, 1973, **12**, 2407.
- [40] A. San Feliciano, M. Gordaliza, M. A. Salinero, J. M. M. del Corral, Abietane Acids : Sources, Biological Activities, and Therapeutic Uses, *Planta Med.*, 1993, **59**, 485
- [41] G.J. Niemann, Phenolic glucosides from needles of Larix laricina, *Phytochemistry*, 1969, **8**, 2101.
- [42] R. Aquino, S. Morelli, A. Tomaino, M. Pellegrino, A. Saija, L. Grumetto, C. Puglia, D. Ventura, F. Bonina, Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of Culcitium reflexum H.B.K. leaves and their major flavanoids, *J. Ethnopharm.*, 2002, **79**, 183.
- [43] B. D. Sloley, L. J. Urichuk, P. Morley, J. Durkin, J. J. Shan, P. K. T. Pang, R. T. Coutts, Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of Ginko Biloba Leaves, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, **52**, 451.
- [44] D. Rigano, C. Formisano, A. Basile, A. Lavitola, F. Senator, S. Rosselli, M. Bruno, Antibacterial Activity of Flavanoids and Phenylpropanoids from Marrubium globosum ssp. Libanoticum, *Phytother. Res. (in press)*, 2006.
- [45] H. Ito, M. Miyake, E. Nishitani, K. Mori, T. Hatano, T. Okuda, T. Konoshima, M. Takasaki, M. Kozuka, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, T. Yoshida, Anti-Tumor Promoting Acitivity of Polyphenol from Cowania mexicana and Coleogyne ramosissima, *Cancer lett.*, 1999, **143**, 5.
- [46] S. Stephen, Preparation of Liniment for Treatment of Arthritis, 1979-05-29, patent number : CA 1055397.
- [47] E. Stahl, Thin-layer chromatography, Springer-Verlag, New York, 1969, 900 pages.

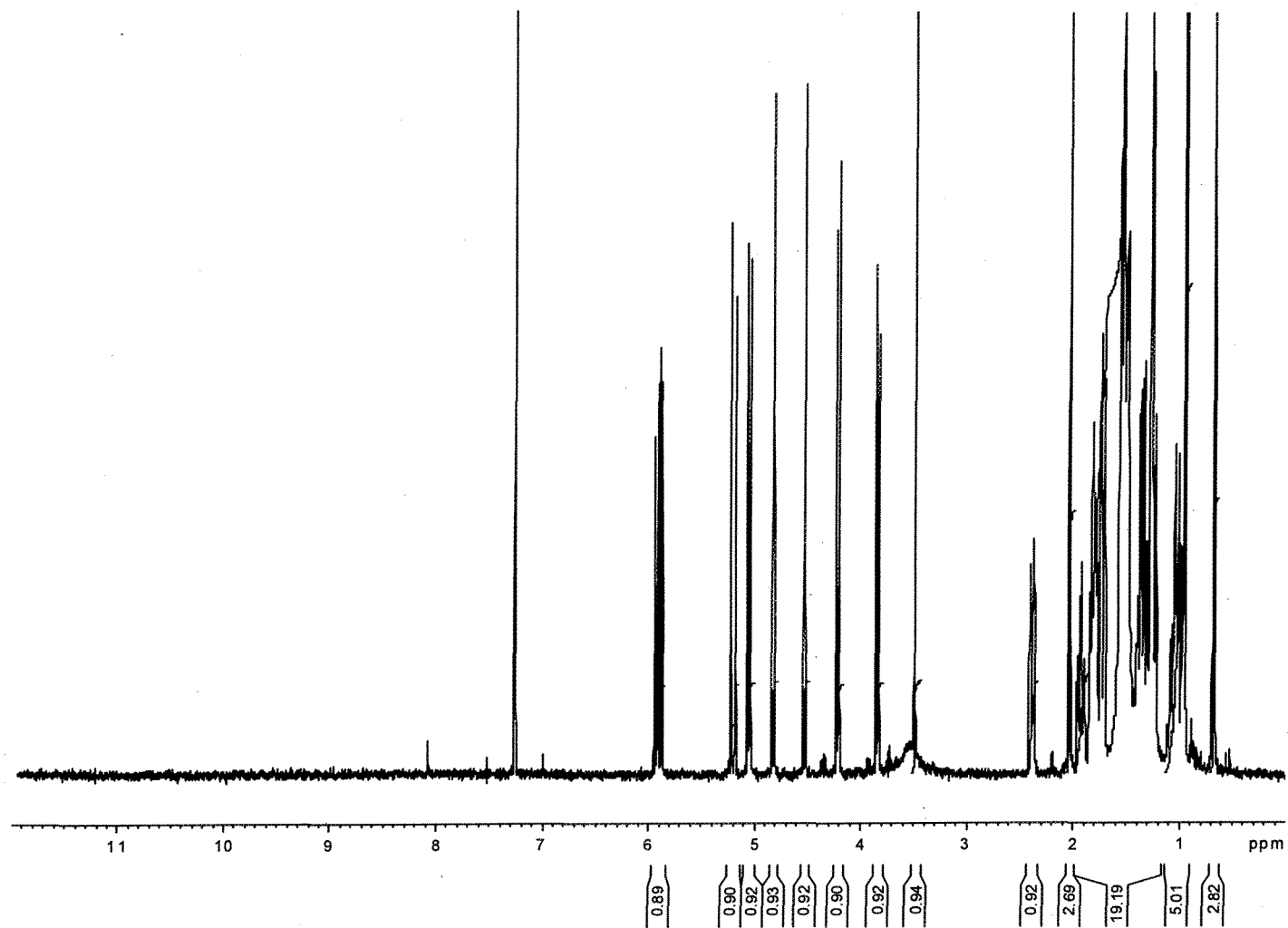
- [48] T. Minami, S.I. Wada, H. Tokuda, G. Tanabe, O. Muraoka, R. Tanaka, Potential Antitumor-Promoting Diterpenes from the Cones of *Pinus luchuensis*, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, 1921
- [49] J.J. Xue, C.Q. Fan, L. Dong, S.P. Yang, J.M. Yue, Novel Antibacterial Diterpenoids from *Larix chinensis* Beissn., *Chemistry and Biodiversity*, 2004, **1**, 1702.
- [50] W.C. Su, J.M. Fang, Y.S. Cheng, Labdanes from *Cryptomeria japonica*, *Phytochemistry*, 1994, **37**, 1109.
- [51] Z. Habibi, F. Eftekhari, K. Samiee, A. Rustaiyan, Structure and antibacterial activity of new labdane diterpenoid from *Salvia leiriaefolia*, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 270.
- [52] J. Jakupovic, E. Ellmauerer, F. Bohlmann, R.M. King, H. Robinson, Ent-Labdane from *Austrobrickellia patens*, *Phytochemistry*, 1986, **25**, 1927
- [53] Y. Kashiwada, G.I. Nonaka, I. Nishioka, Studies on rhubarb (*Rhei Rhizoma*). VI. Isolation and characterization of stilbenes, *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, **32**, 3501
- [54] W.E. Hillis, N. Ishikura, The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives, *J. Chromatogr.*, 1968, **32**, 323
- [55] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of Common laboratory solvents as trace impurities, *J. Org. Chem.*, **62**, 7512.
- [56] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 5421.

ANNEXE 1

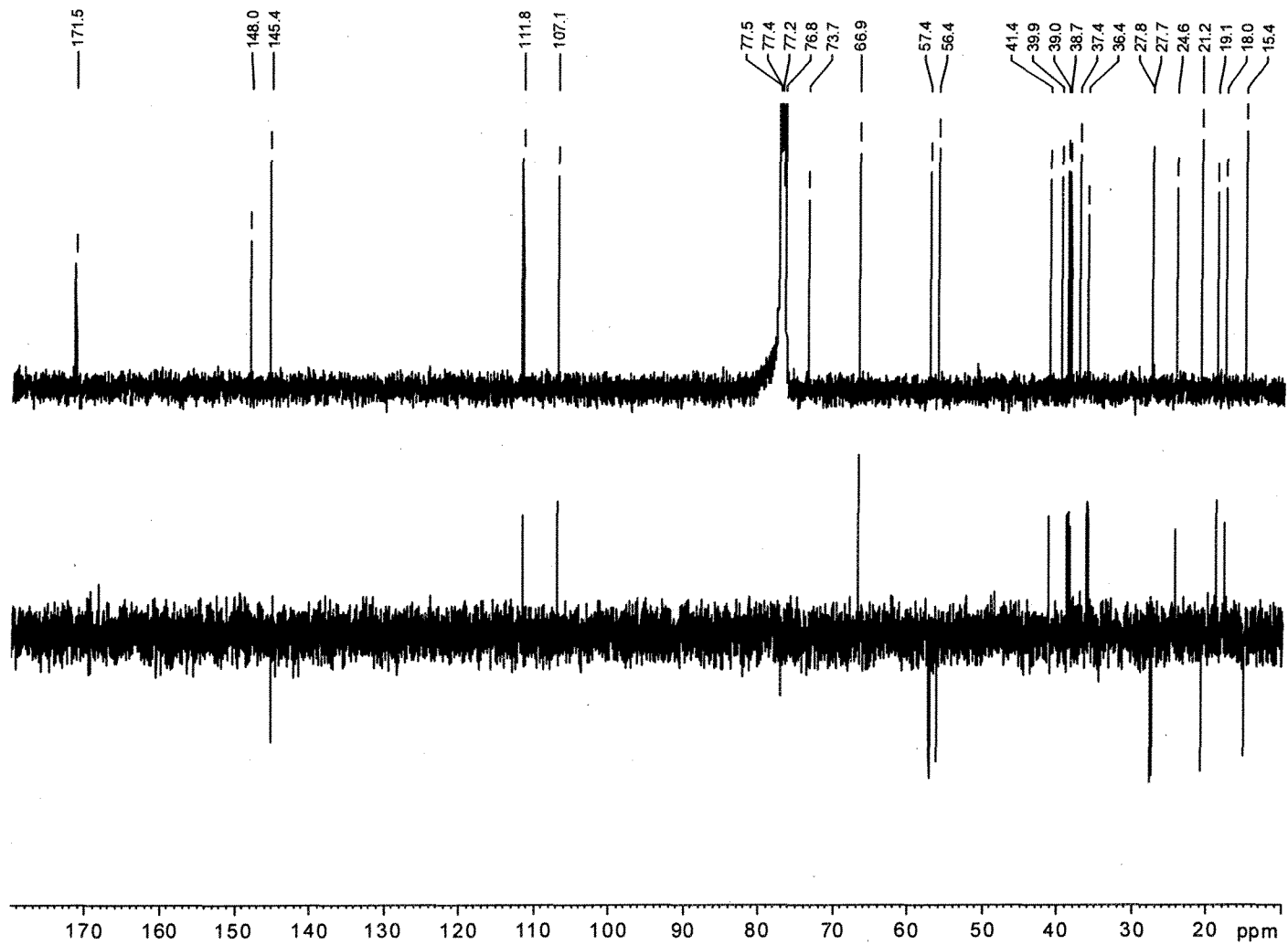
SPECTRE DU 19-ACETOXY-13S-HYDROXLABDA-8(17),14-DIÈNE



Spectre infrarouge du 19-acetoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène



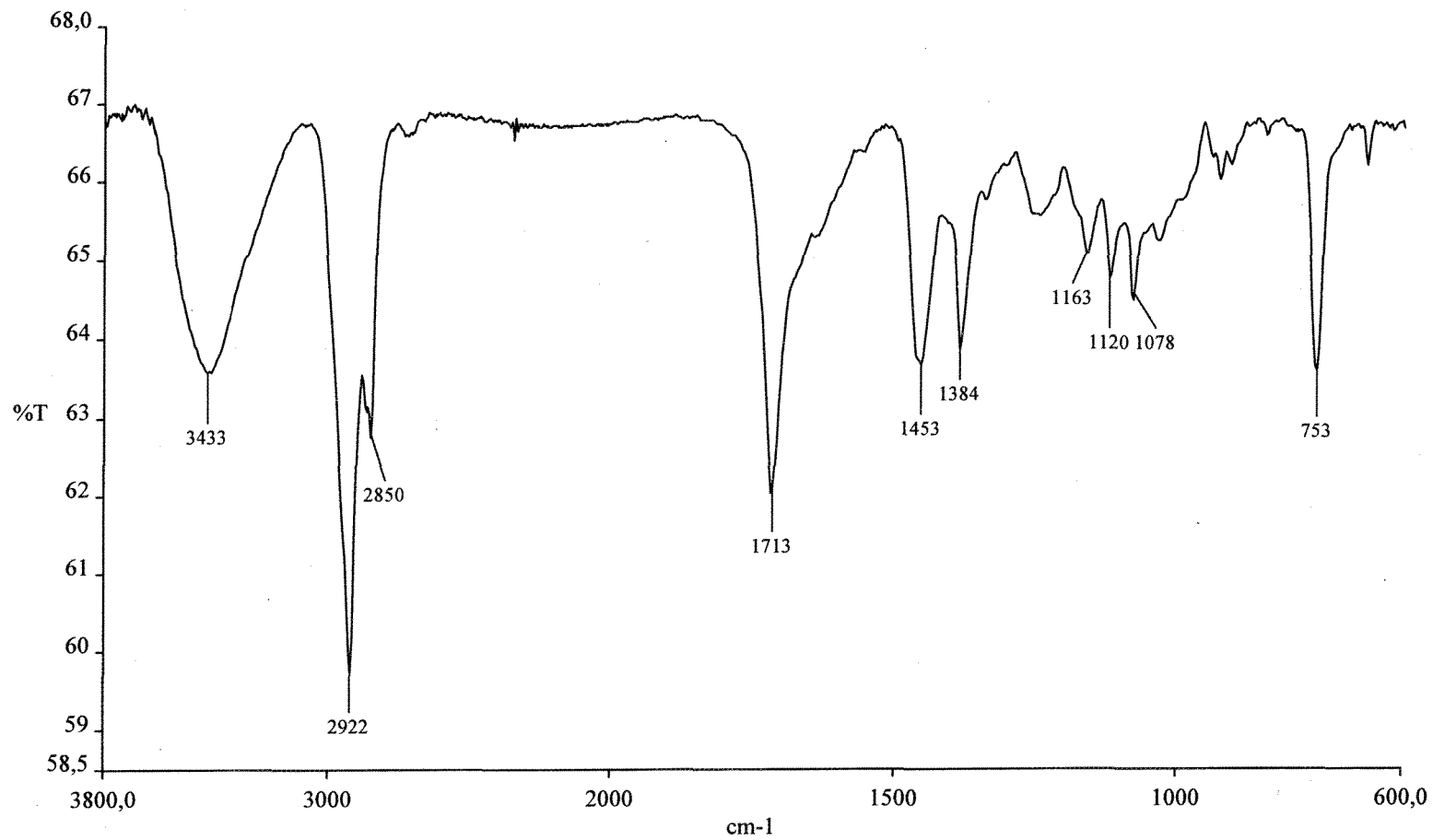
Spectre proton de résonance magnétique du 19-acetoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène



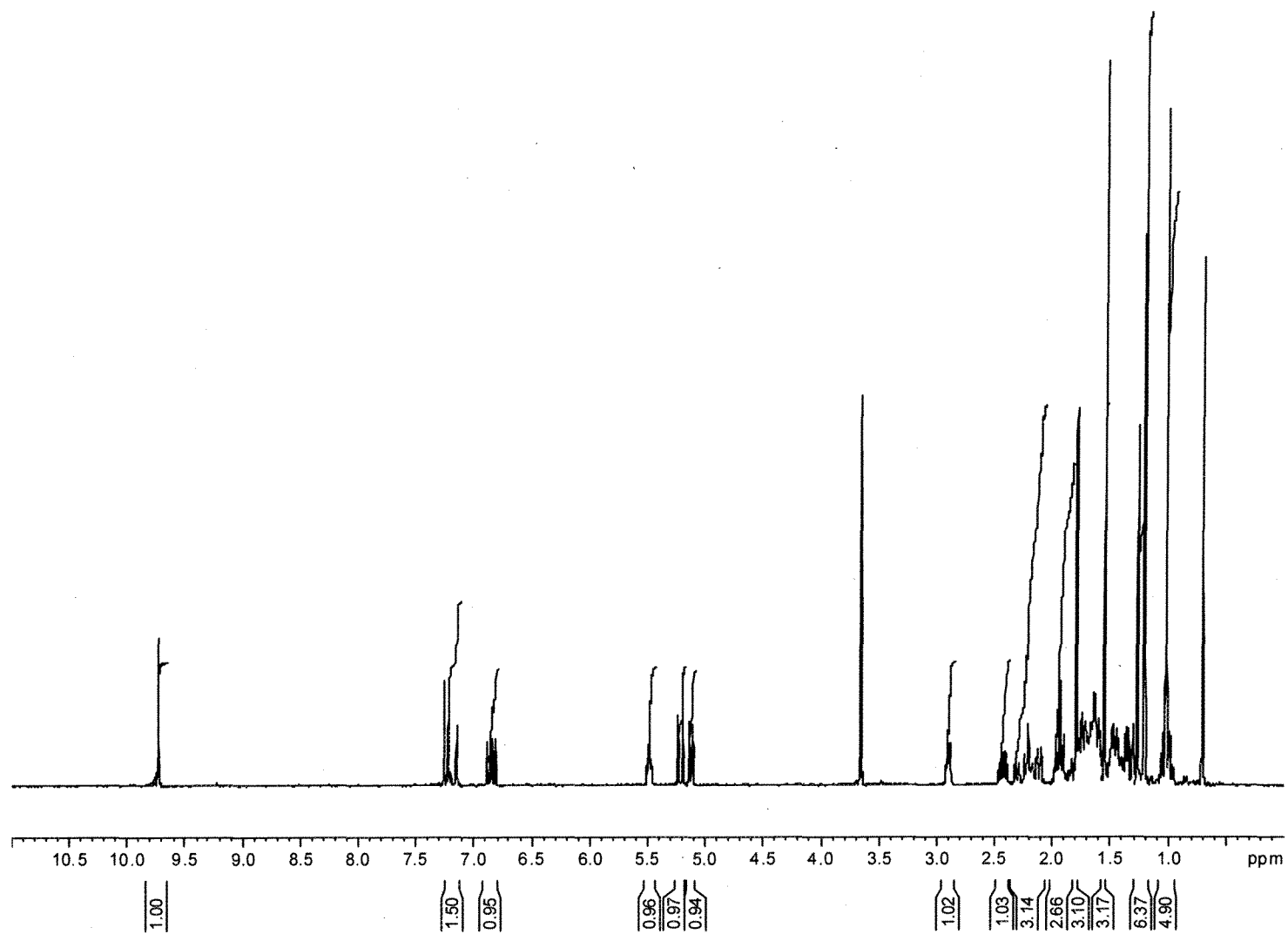
Spectre carbone de résonance magnétique du 19-acetoxy-13S-hydroxylabda-8(17),14-diène

ANNEXE 2

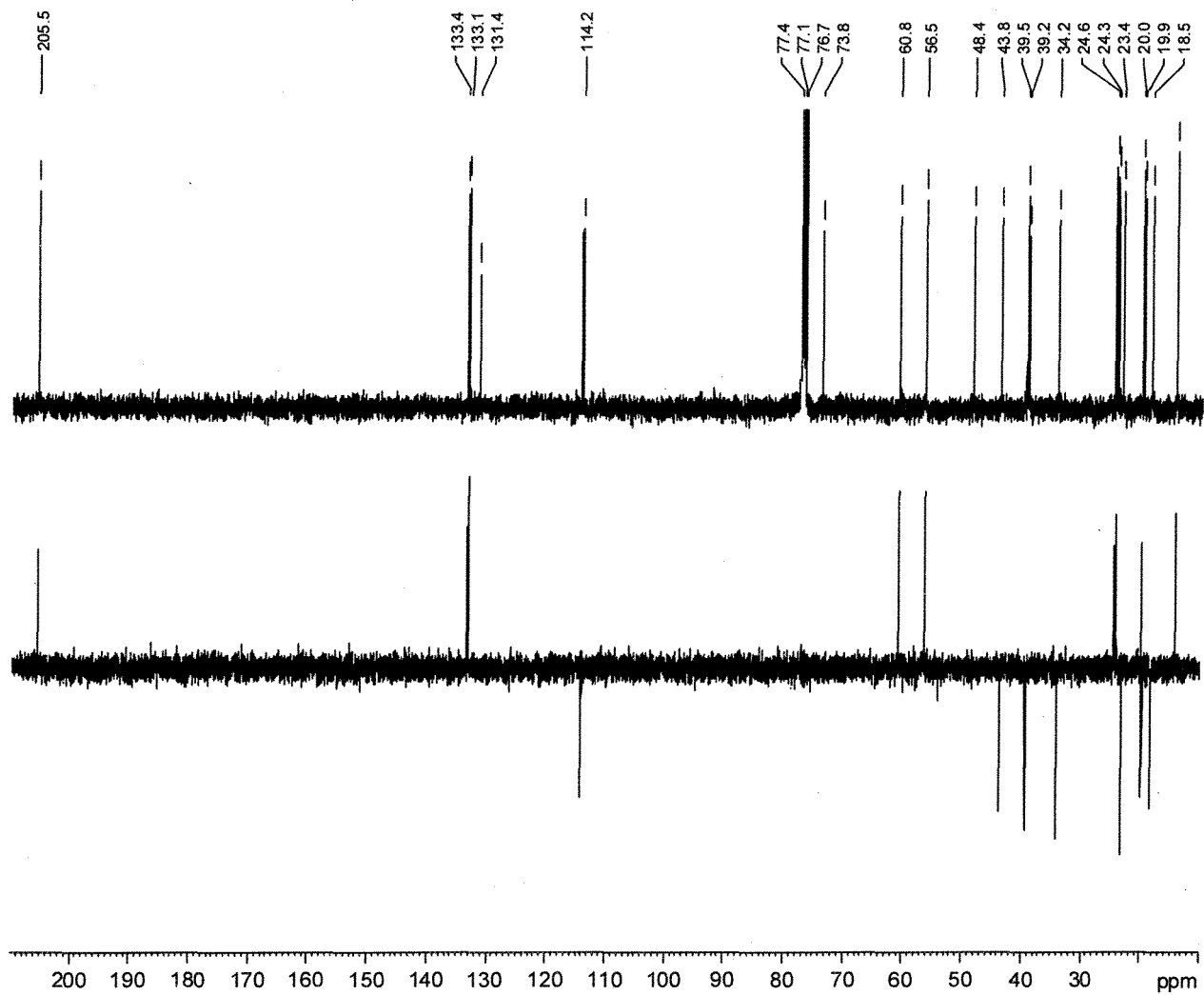
SPECTRE DU 19-OXO-8R-HYDROXYLABDA-12Z,14-DIENAL



Spectre infrarouge du 19-oxo-8R-hydroxyabda-12(Z),14-dienal



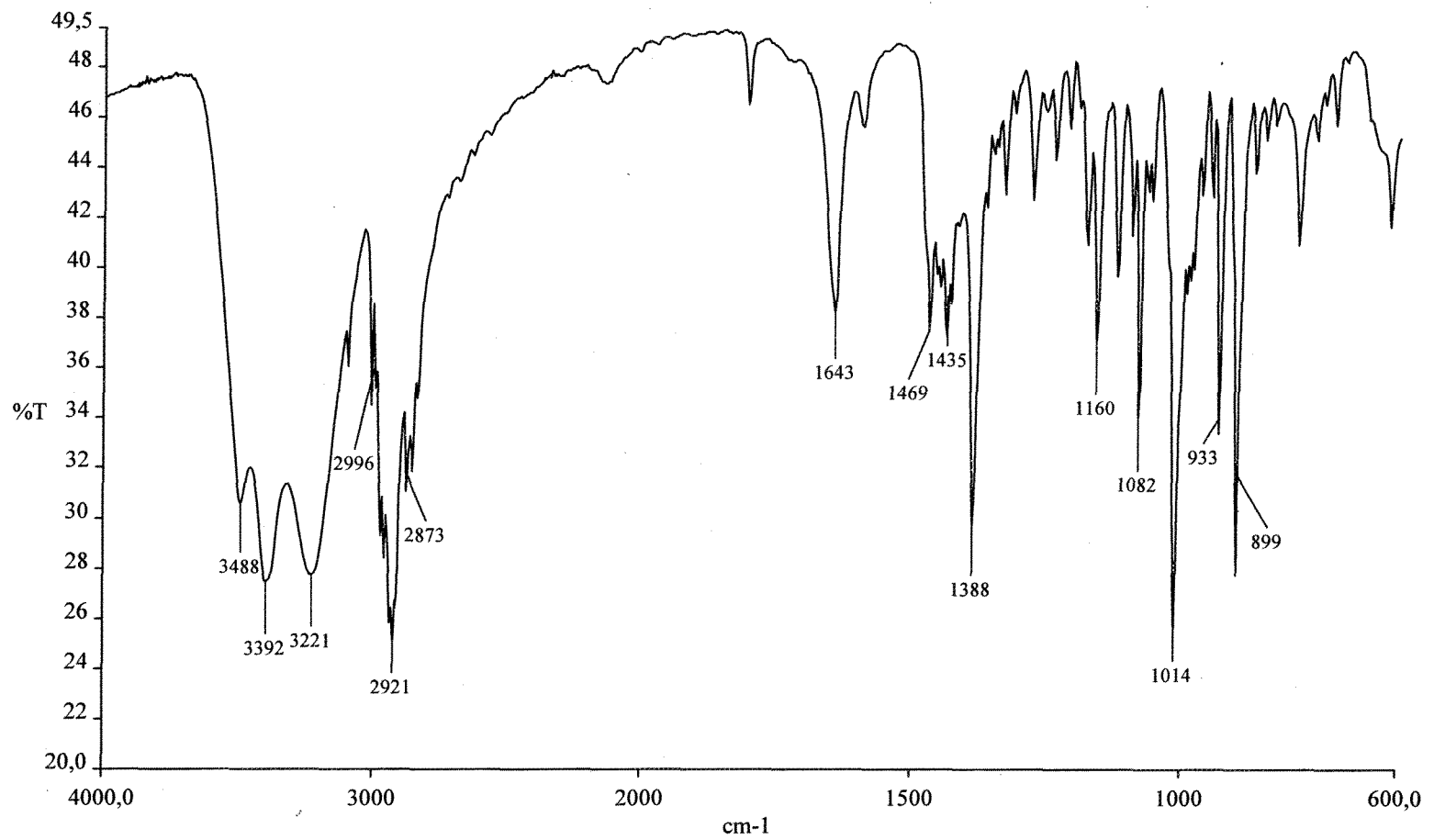
Spectre proton de résonance magnétique du 19-oxo-8R-hydroxylabda-12(Z),14-dienal



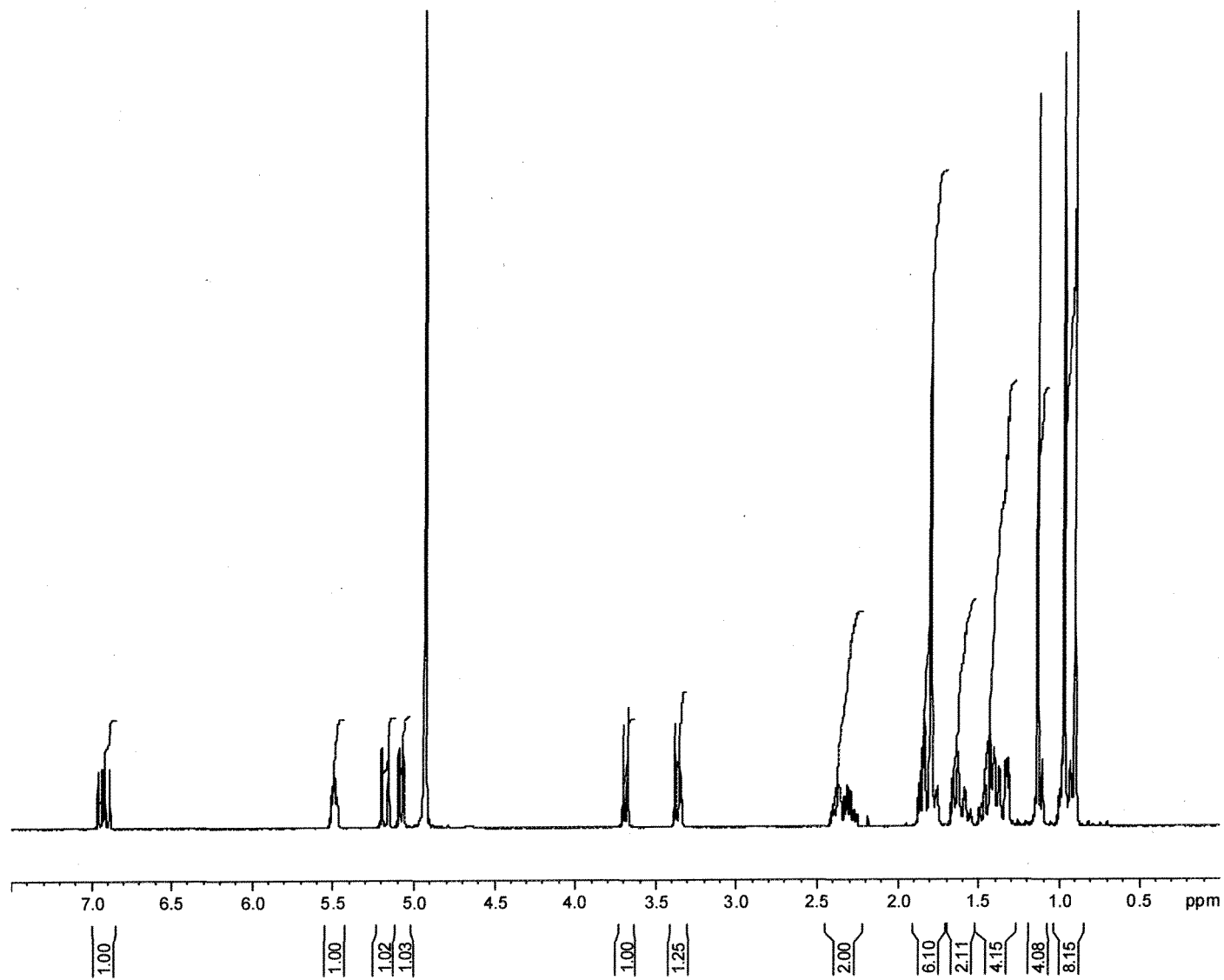
Speetre carbone de la résonance magnétique du 19-oxo-8R-hydroxylabda-12(Z),14-dienal

ANNEXE 3

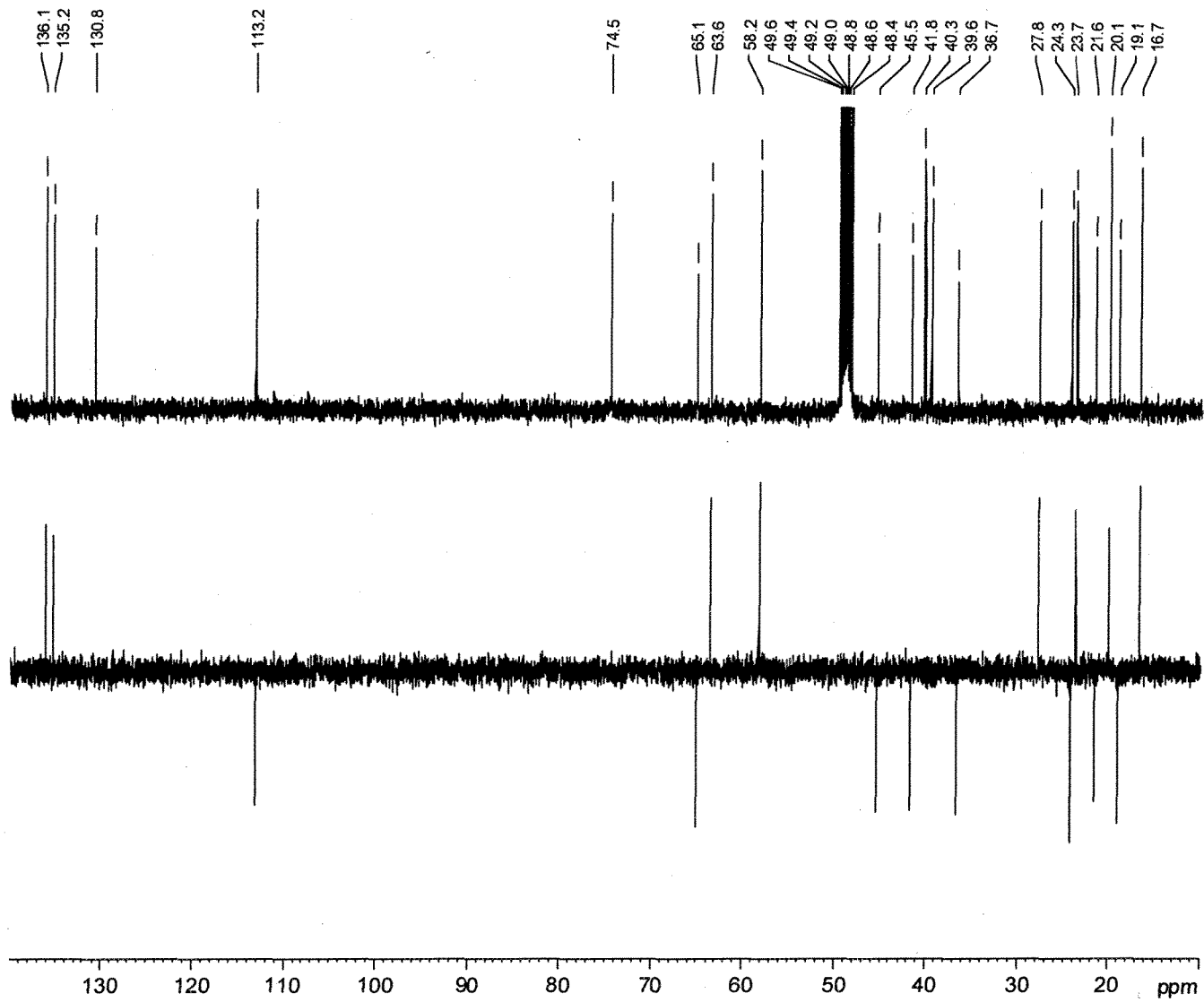
SPECTRE DU *CIS* 19-HYDROXYABIÉROL



Spectre infrarouge du *cis* 19-hydroxyabiéne



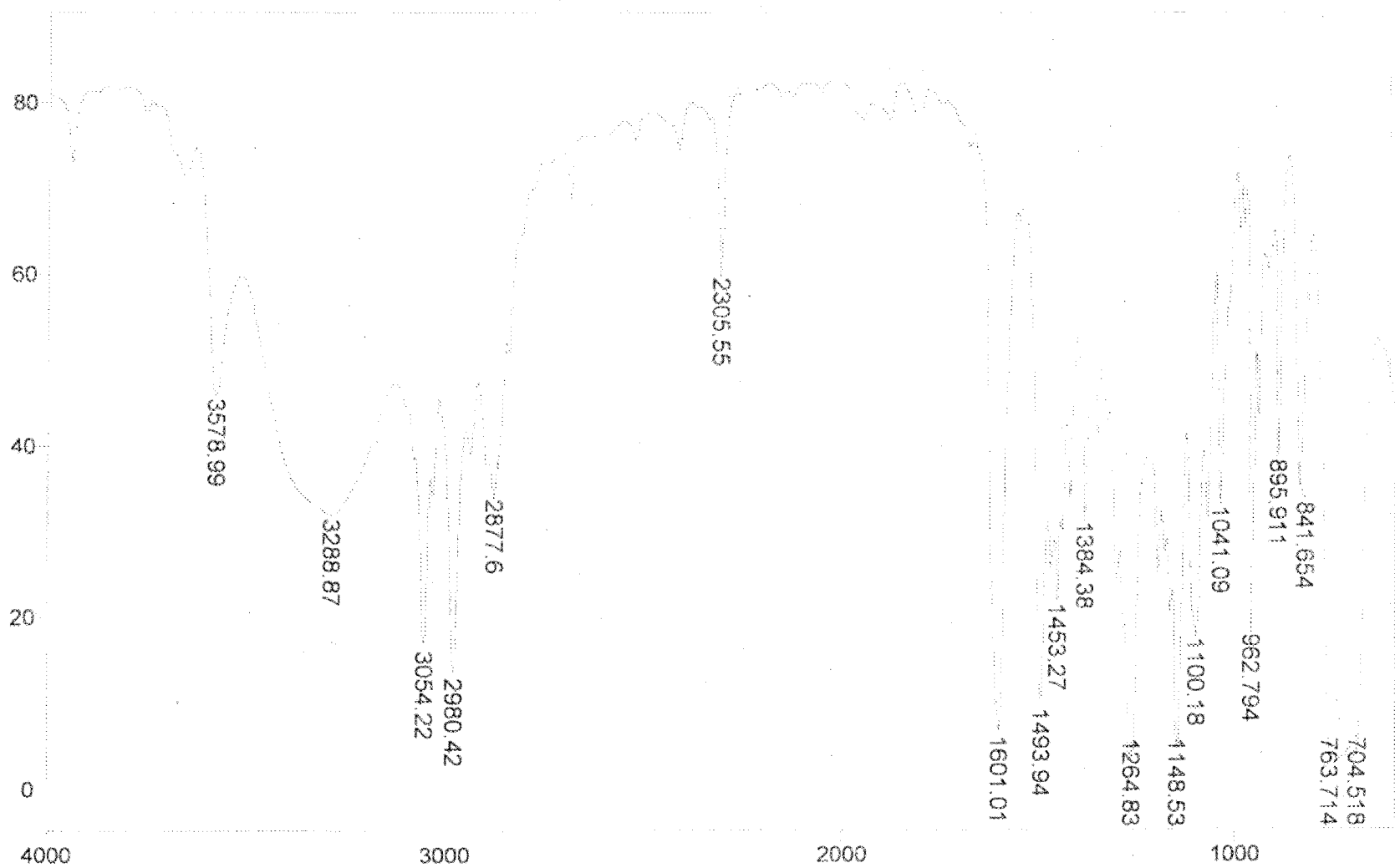
Spectre proton de résonance magnétique du *cis* 19-hydroxyabiéno



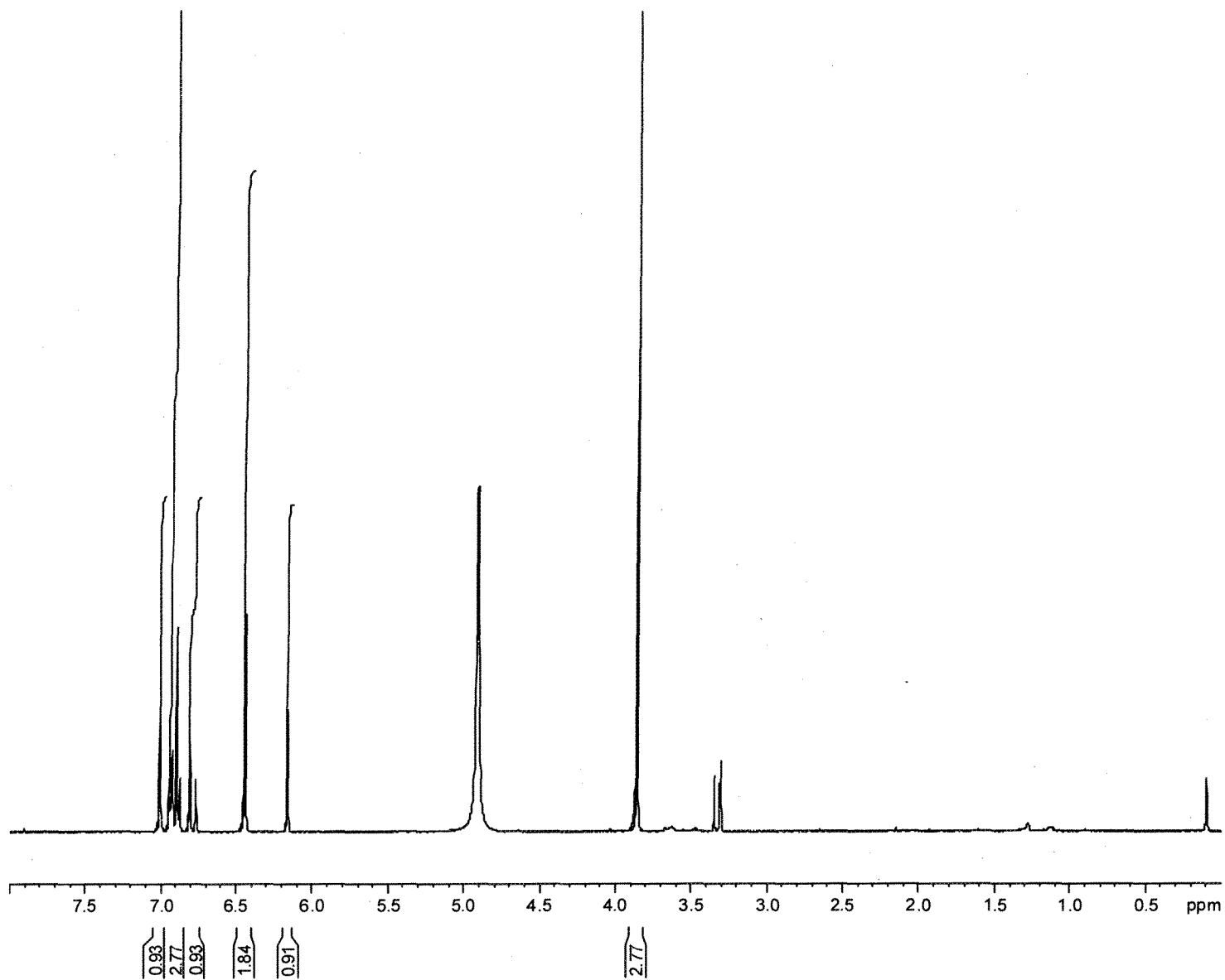
Spectre carbone de résonance magnétique du *cis* 19-hydroxyabiène

ANNEXE 4

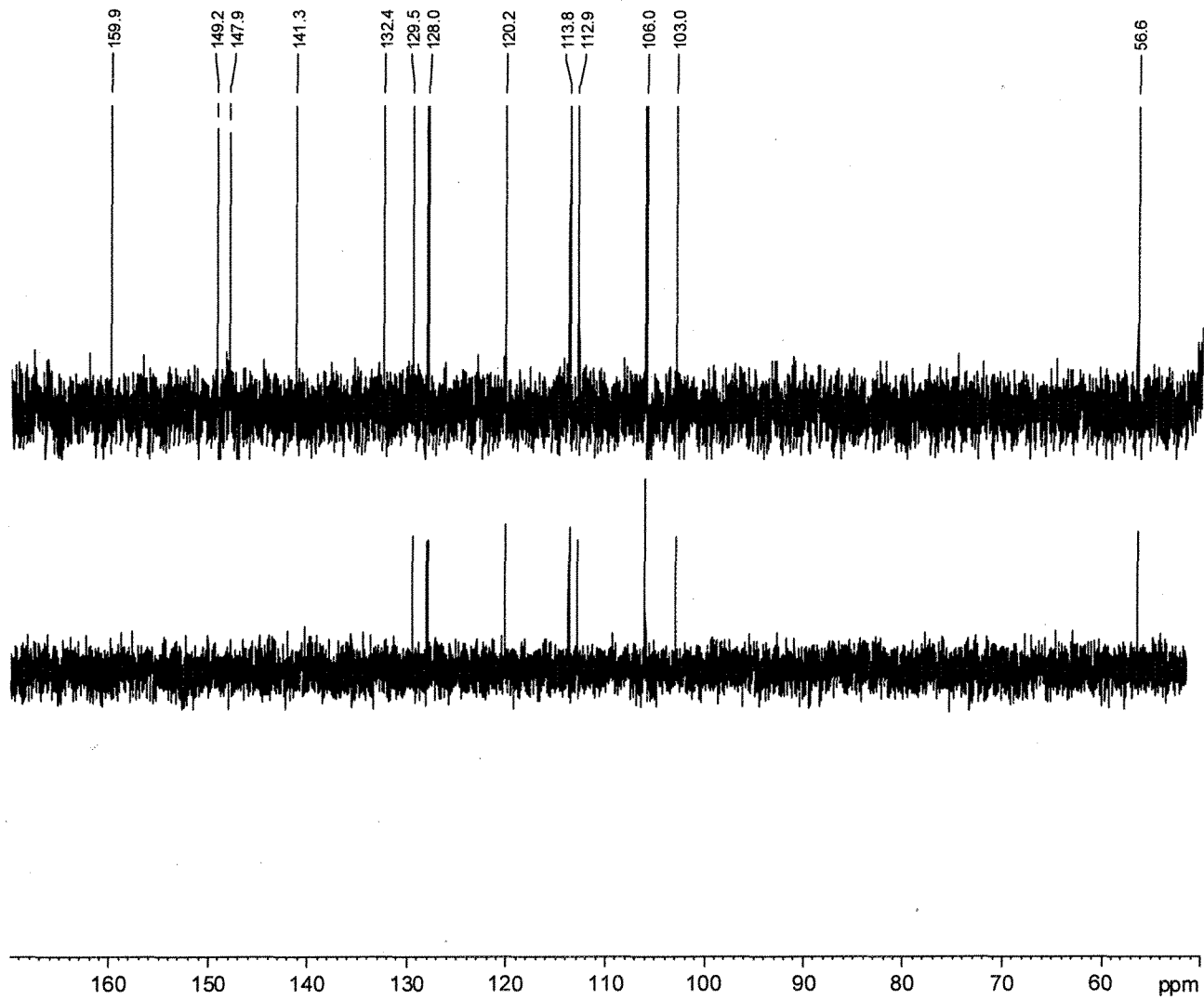
SPECTRE DE LA RHAPONTIGÉNINE



Spectre infrarouge de la rhapontigénine



Spectre proton de résonance magnétique de la rhapontigénine



Spectre carbone de résonance magnétique de la rhapontigénine