



Potentiel de valorisation d'extraits bioactifs issus de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge

Thèse

Naamwin-So-Bâwfu Romaric MEDA

Doctorat en sciences du bois
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Naamwin-So-Bâwfu Romaric MEDA, 2018

Potentiel de valorisation d'extraits bioactifs issus de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge

Thèse

Naamwin-So-Bâwfu Romaric MEDA

Sous la direction de :

Tatjana STEVENOVIC, directrice de recherche
Patrice POUBELLE, codirecteur de recherche

RÉSUMÉ

Les résidus provenant de l'activité de l'industrie forestière canadienne sont estimés chaque année à plus de 20 millions de tonnes de matière sèche. Des extraits réalisés à partir des écorces de troncs retrouvés dans ces résidus et présentant d'intéressantes propriétés biologiques ont été présentés comme une opportunité de valorisation des produits forestiers vers des domaines de plus fortes valeurs ajoutées. Pourtant, les branches des arbres éliminées durant des éclaircies de peuplements forestiers ou pendant les campagnes d'égagement portent également d'autres tissus végétaux dont la composition chimique et les propriétés biologiques peuvent s'avérer distinctes de celles des écorces. Notre hypothèse de recherche est que les érables, espèces d'importance économique majeure et très répandues des forêts canadiennes, dont les bourgeons se retrouvent dans les résidus forestiers, peuvent également servir à la production d'ingrédients actifs pour les secteurs de l'agroalimentaire, des produits cosmétiques et même de la santé (médicaments, phyto-médicaments, nutraceutiques). En effet, du fait de leur caractère indifférencié, ces bourgeons pourraient contenir des métabolites différents de ceux des autres tissus. Notre projet de recherche a donc eu pour principal objectif, l'exploration des domaines potentiels de valorisation de produits naturels issus de bourgeons de l'érable à sucre et de l'érable rouge.

Du fait de la quasi inexistence de données dans la littérature, notre étude a consisté essentiellement à acquérir des connaissances sur la composition chimique de cette matière végétale et à évaluer les effets biologiques *in vitro* d'extraits et / ou de molécules issues de bourgeons d'érable. Pour cela, différentes méthodes d'extractions et différents solvants peu toxiques et respectueux de l'environnement ont été envisagés. Des explorations chimiques par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), des dosages colorimétriques et des déterminations d'activité antioxydante ont ensuite été utilisés pour caractériser et évaluer l'extrait le plus prometteur. La détermination de la nature chimique des constituants majeurs de ce dernier ainsi que des essais biologiques ont été conduits afin de mesurer son potentiel de valorisation dans divers domaines.

Les rendements en extraits secs, la nature et quantité en certains types de composés ainsi que les résultats de tests chimiques d'activité antioxydante ont montré que l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge présentait un réel potentiel de valorisation comme antioxydant naturel. L'identification des composés phénoliques contenus dans cet extrait et leur quantification ont permis de révéler une forte présence de gallo-tannins, mais également d'hétérosides de quercétine et de cyanidine qui ont été décrits pour la première fois dans cette espèce. L'exploration des effets de cet extrait sur les neutrophiles humains comme première approche n'a indiqué aucune toxicité ni modification significative de leur viabilité jusqu'à 100 µg/mL. Cependant pour des plus fortes concentrations, l'extrait a montré une capacité à accélérer la mort programmée de ces cellules majeures de l'inflammation et cette activité serait due à certains gallotanins. Cette propriété biologique mise en évidence pour la première fois ouvre le champ à de nombreuses voies de valorisation notamment dans la résolution du processus inflammatoire où la survie des neutrophiles est incontestablement liée au développement de pathologies chroniques

ABSTRACT

The residues from the activities of Canadian forest industry are estimated to be more than 20 million tons of dry matter per year. The extractives of trunk barks from these residues have been studied as a way to valorize these non- wood forest products in areas with higher added values based on their interesting biological properties for human health. However, branches of the trees removed during thinning or pruning also carry other plant tissues with chemical composition and biological properties distinct from barks. Our research hypothesis was that maples, the widespread trees with major economic value from Canadian forests, represent a source of important quantities of forest residues containing buds which could be used to produce active ingredients for food industry and healthcare (drugs, phytomedications, and nutraceuticals). Indeed, buds contain important amount of meristems, undifferentiated embryonic tissues that may be rich in some bioactive compounds that are often found only in small quantities in other plant parts. Thus, the main objective of our research project was to explore the potential areas of valorization of natural products derived from sugar and red maple buds

No data dealing with the chemical composition of this plant material nor biological effects of extracts and / or molecules derived from maple buds were found in scientific literature. The extracts of maple buds (therefore obtained with not toxic and environment- respectful solvents), were analysed by qualitative approach by Thin Layer Chromatography (TLC) assays for screening of phytochemicals. The quantitative assays and antioxidant activity assessment were used to characterize and evaluate the best promising extract. The major phytochemicals of the latter were identified, along with the biological tests undertaken in order to measure its potential of valorization in several fields

The yields of dry matter, the nature and quantity of some potential bioactive compounds and the results on antioxidant activities evaluation showed that the hot water extract of red maple buds has a real potential for development as natural antioxidant. The identification of the major phenolic compounds contained in this extract and their quantification revealed an important concentration of gallo-tannins, along with quercetin and cyanidin glycosides, determined in this study for the first time in this species. Exploration of the effects of water extract from red maple buds on human neutrophils as a first approach indicated no toxicity nor significant modification of their viability up to 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. However, for higher concentrations, the extract showed an ability to accelerate the programmed death of these major cells of inflammation. Further studies revealed that this activity was due to particular gallotannins. This biological property highlighted for the first time opens the field to several ways of valorization especially for the resolution of inflammatory processes in which neutrophil survival is undoubtedly linked to the development of chronic pathologies

TABLE DES MATIÈRES

RESUME.....	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
REMERCIEMENTS.....	XVII
AVANT-PROPOS	XVIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE ET OBJECTIF DE RECHERCHE	5
CHAPITRE 1 : LES ERABLES ET LEURS BOURGEONS	6
1. <i>Érable à sucre et érable rouge</i>	6
1.1 Taxonomique des érables.....	6
1.2 Répartition géographique.....	6
1.3 Description botanique	7
1.4 Utilisations rapportées de ces essences	8
2. <i>Les bourgeons et la dormance</i>	8
2.1 Les différents types de bourgeons.....	8
2.2 Structure du bourgeon.....	9
2.3 La dormance	10
2.3.1 Les différents types de dormance	10
2.3.2 Régulation de la dormance	10
CHAPITRE 2 : LES EXTRACTIBLES DE PRODUITS NATURELS	12
1. <i>Généralité sur les extractibles</i>	12
1.1 Les principales familles de produits naturels	12
1.1.1 Les glucides.....	13
1.1.2 Les poly-acétates.....	14
1.1.3 Les composés phénoliques.....	17
1.1.4 Les terpénoïdes et stéroïdes.....	21
1.1.5 Les acides aminés et les composés issus de leur métabolisme	26
1.2 Méthodes d'obtention d'extractibles.....	30
1.2.1 Les méthodes d'extraction classiques	30
1.2.2 Les méthodes d'extraction non conventionnelles	31
1.3 Méthodes d'analyse des extractibles.....	33
1.3.1 Les méthodes de détection et de quantification colorimétriques	33
1.3.2 Méthodes de séparation et de purification	37
1.3.3 Les méthodes de caractérisation et d'identification.....	44
2. <i>Les extractibles de l'érable</i>	47
2.1 Chimio-taxonomie des Sapindacées.....	47
2.2 Métabolites et activités biologiques décrites chez <i>Acer saccharum</i> et <i>Acer rubrum</i>	48
CHAPITRE 3 : STRESS OXYDANT ET POUVOIR ANTIOXYDANT	52
1. <i>Oxydation en milieu biologique</i>	52
2. <i>Systèmes antioxydants</i>	53
2.1 Nature des antioxydants	53
2.1.1 Antioxydants endogènes	53
2.1.2 Antioxydants exogènes	54
2.2 Mécanismes d'action antioxydante	55

2.2.1	L'activité antioxydante directe	55
2.2.2	L'activité antioxydante indirecte	58
3.	<i>Test d'activité antioxydante in vitro</i>	58
3.1	Les tests anti-radicalaires classiques	58
3.1.1	Tests chimiques	58
3.1.2	Tests biologiques	61
3.2	Les tests associant des techniques séparatives	62
3.2.1	La bioautographie	62
3.2.2	HPLC - DPPH•	63
4.	<i>Le stress oxydant, l'inflammation et les maladies chroniques</i>	64
CHAPITRE 4 : NEUTROPHILES ET RÉPONSES INFLAMMATOIRES		66
1.	<i>Généralités sur le système immunitaire</i>	66
1.1	Les différents acteurs du système immunitaire	66
1.1.1	Les cellules	66
1.1.2	Les organes lymphoïdes	68
1.1.3	Les médiateurs du système immunitaire	68
1.2	Les réponses immunitaires	72
1.2.1	Les mécanismes de la réaction inflammatoire aiguë	73
1.2.2	Les mécanismes de l'inflammation chronique	77
2.	<i>Les neutrophiles comme modèles d'exploration de la réponse immunitaire</i>	80
2.1	Physiologie du neutrophile et son rôle dans les réponses immunitaires	80
2.1.1	Caractéristiques et métabolisme des neutrophiles quiescents	80
2.1.2	Métabolisme des neutrophiles apprêtés / activés	81
2.1.2	Rôle des neutrophiles dans la pathogénèse et la modulation des maladies inflammatoires	87
2.2	Exploration de la viabilité des neutrophiles	92
2.2.1	Analyse de la morphologie cellulaire	93
2.2.2	Tests de colorant d'exclusion	93
2.2.3	Évaluation du métabolisme cellulaire	93
2.2.4	Évaluation du relargage de lactate déshydrogénase (LDH)	93
2.2.5	Test à l'annexine V / PI ou 7-AAD	94
2.2.6	Exploration des caspases	96
2.2.7	Évaluation du potentiel membranaire mitochondrial	96
2.2.8	Électrophorèse de l'ADN	96
CHAPITRE 5 : OBJECTIFS DE RECHERCHE		97
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES		98
CHAPITRE 1 : LA MATIÈRE VÉGÉTALE		99
1.	<i>Récolte des bourgeons</i>	99
2.	<i>Lyophilisation et broyage</i>	100
CHAPITRE 2 : EXPLORATIONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES		101
1.	<i>Essais physicochimiques sur la matière végétale</i>	101
1.1	Détermination de la teneur en humidité	101
1.2	Détermination des cendres totales	101
2.	<i>Exploration chimique des extractibles de bourgeons d'érables</i>	101
2.1	Extractions	101
2.2	Exploration qualitative des métabolites extraits des bourgeons d'érables	102
2.3	Explorations quantitatives des métabolites présents dans les extraits des bourgeons	103
2.3.1	Estimation des protéines	103
2.3.2	Évaluation des sucres totaux	103
2.3.3	Évaluation des composés phénoliques	104
2.3.4	Évaluation des saponosides	105
2.4	Séparation, de purification et de caractérisation des composés	106
2.4.1	Analyses en HPLC	106
2.4.3	Purification des composés phénoliques et analyse RMN	107
3.	<i>Exploration d'activité antioxydante d'extraits d'érables</i>	108
3.1	Mesures de la capacité anti-radicalaire	108

3.1.1	Test au DPPH*	108
3.1.2	Test d'anion superoxyde	108
3.2	Mesure de la capacité antioxydante par le test ORAC	108
4.	<i>Exploration de l'effet d'extraits et /ou de molécules sur la viabilité des neutrophiles</i>	109
4.1	Purification des neutrophiles	109
4.2	Essais de viabilité cellulaire	109

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS 110

RÉSULTATS 1 : UNE MATIÈRE VÉGÉTALE CONFORME AUX NORMES DES PHARMACOPÉES	111
---	-----

RÉSULTATS 2 : UNE DIVERSITÉ DE PRODUITS NATURELS D'INTÉRÊT DANS LES EXTRAITS DE BOURGEONS D'ÉRABLE	113
--	-----

1.	<i>Contexte / Transition</i>	113
2.	<i>Résumé</i>	114
3.	<i>Nature chimique des composés présents dans les extraits de bourgeons d'érable</i>	115
3.1	Potentiellement des acides aminés atypiques dans les extraits	116
3.2	Potentiellement des saponosides et /ou de polysaccharides dans les extraits	116
3.3	Une grande diversité de composés phénoliques dans les extraits	118
4.	<i>Article 1</i>	119
4.1	Abstract	120
4.2	Introduction	121
4.3	Materials and methods	122
4.3.1	Chemicals	122
4.3.2	Plant materials	122
4.3.3	Extraction procedure	122
4.3.4	Explorative analysis of phenolic fingerprints of maple bud extracts	122
4.4	Results and discussion	123
4.5	Conclusion	126
4.6	Conflict of interest and Acknowledgments	127
5.	<i>Contributions majeures à l'amélioration des connaissances</i>	128

RÉSULTATS 3 : LES TENEURS EN METABOLITES D'INTÉRÊT SUGGÈRENT DES POTENTIELS DE VALORISATION DIFFÉRENTS POUR LES EXTRACTIBLES DE BOURGEONS DE CES DEUX ESSENCES	129
--	-----

1.	<i>Contexte / Transition</i>	129
2.	<i>Résumé</i>	130
3.	<i>Article 2</i>	131
3.1	Abstract	132
3.2	Introduction	133
3.3	Materials and methods	134
3.3.1	Plant materials	134
3.3.2	Extraction procedure	134
3.3.3	Spectrophotometric determination of phenolic contents	134
3.3.4	Antioxidant capacity evaluation	135
3.3.5	Statistical analysis	136
3.4	Results and discussion	136
3.4.1	Extraction yields of maple bud samples	136
3.4.2	Quantification of phenolic compounds in maple bud's extracts	137
3.4.3	Antioxidant activity of maple bud extracts	139
3.4.4	Relationship between phenolic contents and antioxidant test	140
3.5	Conclusion	141
3.6	Conflict of interest and Acknowledgments	142
4.	<i>Résultats complémentaires</i>	144
4.1	Essais de confirmation de la présence de saponosides	144
4.2	Estimation des dérivés d'acides aminés et de dérivés glucidiques	145
4.3	Profils chimiques des composés phénoliques des extraits aqueux de RMB et SMB	146

5.	<i>Contributions majeures à l'amélioration des connaissances</i>	148
RÉSULTATS 4 : DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET UNE CAPACITÉ À MODULER LA VIABILITÉ DES NEUTROPHILES HUMAINS DÉCRITS POUR LA PREMIÈRE FOIS POUR DES EXTRAITS D'ÉRABLE ROUGE		
149		
1.	<i>Contexte / Transition</i>	149
2.	<i>Résumé</i>	150
3.	<i>Article 3</i>	151
3.1	Abstract	152
3.2	Introduction	153
3.3	Results and Discussion	153
3.3.1	Antioxidant capacity of the RMB hot water extract	153
3.3.2	Characterization of phenolic constituents of RMB hot water extract	154
3.3.3	Quantitative analysis of phenolic constituents	156
3.3.4	Effects of RMB hot water extract on viability of human blood neutrophils	157
3.4	Conclusions	161
3.5	Experimental Section	162
3.5.1	General experimental procedures	162
3.5.2	Chemicals and reagents	162
3.5.3	Plant materials	163
3.5.4	Measurements of antioxidant capacity	164
3.5.5	HPLC-MS Analysis	164
3.5.6	HPLC quantification of the phenolic constituents	165
3.5.7	Determination of viability of neutrophils	165
3.5.8	Statistical analysis	165
3.7	Acknowledgements	166
3.8	Author Contribution Statement	166
4.	<i>Contributions majeures à l'amélioration des connaissances</i>	167
RÉSULTATS 5: LES GALLOTANINS DÉRIVÉS D'ANHYDROGLUCITOL ET SONT RESPONSABLES DE L'EFFET PRO-APOPTOTIQUE DE L'EXTRAIT D'ÉRABLE ROUGE SUR LES NEUTROPHILES		
168		
1.	<i>Contexte / Transition</i>	168
2.	<i>Résumé</i>	169
3.	<i>Article 4</i>	170
3.1	Abstract	171
3.2.	Introduction	172
3.3	Material and methods	173
3.3.1.	Preparation of polyphenolic-enriched fractions and pure compounds from RMB-hwe	173
3.3.2	Phytochemical assessments	174
3.3.3	Neutrophils viability assays	174
3.3.4	Statistical Analysis	176
3.4	Results	176
3.4.1	Effects of RMB-hwe and its fractions on the viability of human neutrophils	176
3.4.2	Phytochemical analysis of enriched-fractions from RMB-hwe	176
3.4.3	Some of the major ACGs induced apoptosis of neutrophils at high concentration.	177
3.4.4	Effect of equimolar mixtures of active maple gallotannins on neutrophil apoptosis.	177
3.5	Discussion	178
3.6	Conclusion	180
4.	<i>Contributions majeures à l'amélioration des connaissances</i>	187
QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION / CONCLUSION/ PERSPECTIVE		
188		
DISCUSSION GÉNÉRALE		
189		
1.	<i>Des potentiels de valorisation différents pour les extraits de bourgeons de ces deux essences</i> ..	190
2.	<i>L'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge et sa fraction butanol : des antioxydants naturels riches en gallotanins</i>	192

2.1	Composition chimique et propriété biologiques des antioxydants contenus dans les produits naturels issus d'extraits de bourgeons.	192
2.2	Potentiels de valorisation de la capacité antioxydante des produits naturels issus d'extraits de bourgeons.	193
2.3	Toxicité d'antioxydants naturels issus d'extraits aqueux de bourgeons d'érable rouge	193
3.	<i>L'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge comme une source majeur de ginnaline A : Une molécule aux nombreuses applications</i>	194
3.1	La ginnaline A dans le genre Acer	194
3.2	La ginnaline A, une molécule aux nombreuses activités biologiques in vitro	195
4.	<i>La fraction éthyle acétate de bourgeons d'érable rouge: Un concentré de gallotanins capable de moduler la réponse inflammatoire via l'apoptose des neutrophiles.</i>	196
	CONCLUSIONS GÉNÉRALES	197
	PERSPECTIVE ET TRAVAUX EN COURS	199
1.	<i>Définition de marqueur d'identification chimique et microscopique de la matière végétale</i>	199
2.	<i>Analyses chimiques du contenu à approfondir.</i>	199
3.	<i>Mécanisme d'action moléculaire et activité antiinflammatoire de la ginnaline A in vivo</i>	200
4.	<i>Données de pharmacocinétique de la ginnaline A</i>	200
5.	<i>Preuves de sécurité d'utilisation</i>	200
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201

LISTE DES FIGURES

Partie 1

Figure 1.1 : Répartition géographique des essences de notre étude.....	6
Figure 1.2: Caractère morphologique des essences de notre étude.	7
Figure 1.3: Organisation des bourgeons sur une tige,	9
Figure 1.4: Coupe longitudinale et structure d'un bourgeon.....	9
Figure 1.5: Exemples d'hormones végétales.	11
Figure 1.6: Modèle de régulation de la sortie de dormance.	11
Figure 1.7 : Exemples de monosaccharides.....	13
Figure 1.8: Structure du lactose.....	14
Figure 1.9 : Structure de l'acarbose.	14
Figure 1.10: La voie de l'acide malonique (acétates)	15
Figure 1.11: Exemple d'eicosanoïdes.....	16
Figure 1.12: Exemples d'anthraquinones.	17
Figure 1.13: Structure de l'amphotéricine B.....	17
Figure 1.14: Exemple de composés non-phénoliques.....	18
Figure 1.15: La voie des shikimates et sous-classes de composés phénoliques dérivées.	18
Figure 1.16: Les lignanoïdes.	19
Figure 1.17: Les composés phénoliques issus des voies mixtes (acétates / shikimates).	20
Figure 1.18: Voie de biosynthèse de terpénoïdes.	22
Figure 1.19: Exemples de monoterpènes.	23
Figure 1.20 : Structure de l'artémisinine..	23
Figure 1.21: Structure du pacitaxel.	23
Figure 1.22: Structure du lamostérol.	24
Figure 1.23: Structure du campestérol.....	24
Figure 1.24: Structure de l'acide glycyrrhizique.....	24
Figure 1.25: Structure de la digoxine.....	25
Figure 1.26: Structure du β -carotène.....	25
Figure 1.27: Structure du tocophérol α	26
Figure 1.28: Exemples d'acides aminés non protéiques.	27
Figure 1.29: Structure de la vancomycine.	27
Figure 1.30: Structure de la morphine.	28
Figure 1.31: Structure de l'amygdaline.	29
Figure 1.32: Structure de la sinalbine.	29
Figure 1.33: Structure de la bétanine.	29
Figure 1.34: Exemple de tétrapyroles.....	30
Figure 1.35: Principe de l'extraction au soxhlet.	31
Figure 1.36 Les différentes technologies membranaires de séparation.	38

<i>Figure 1.37 : Chromatographie en phase gazeuse avec système de collecte.</i>	40
<i>Figure 1.38 : Les différentes composantes de l'HPLC.</i>	43
<i>Figure 1.39 : Exemples de régulation de la transcription médiée par les ROS</i>	53
<i>Figure 1.40: Les étapes du processus général de l'oxydation.</i>	55
<i>Figure 1.41: Éléments de structure potentialisant l'inhibition de la NADPH oxydase.</i>	56
<i>Figure 1.42: Propriétés chélatantes des polyphénols.</i>	56
<i>Figure 1.43 : Les paramètres Influencant la réactivité des antioxydants.</i>	57
<i>Figure 1.44 : Principe du test ORAC.</i>	60
<i>Figure 1.45: Principe du test au DPPH.</i>	61
<i>Figure 1.46: Principe du test de l'activité antioxydante cellulaire.</i>	62
<i>Figure 1.47: Résultat d'un test de bioautographie par le DPPH.)</i>	63
<i>Figure 1.48: Dispositif expérimental pour l'analyse On line HPLD – DPPH.</i>	63
<i>Figure 1.49: Réactivité de gallotannins d'érable rouge observée à 280 nm. Adapté avec autorisation de.</i>	64
<i>Figure 1.50: Le diagramme de l'hématopoïèse.</i>	66
<i>Figure 1.51: Les fonctions immunitaires des anticorps.</i>	69
<i>Figure 1.52 : Les voies d'activation et les fonctions effectrices du complément.</i>	70
<i>Figure 1.53 : Les lipides bioactifs de la voie de l'acide arachidonique.</i>	71
<i>Figure 1.54 : Nature des cellules impliquées en fonction de la réponse immunitaire.</i>	73
<i>Figure 1.55: Phase cellulaire de recrutement des leucocytes au site du stimulus inflammatoire.</i>	75
<i>Figure 1.56 : Polarisation et fonctions immunitaires des macrophages.</i>	78
<i>Figure 1.57 : Les principaux effecteurs issus de l'activation des lymphocytes T4.</i>	79
<i>Figure 1.58 : Aperçu des cytokines produites par les neutrophiles.</i>	83
<i>Figure 1.59: Les mécanismes de l'apoptose cellulaire.</i>	85
<i>Figure 1.60 : Conséquences du devenir des neutrophiles après la réponse inflammatoire.</i>	88
<i>Figure 1.61 : Principe du test LDH.</i>	93
<i>Figure 1.62 : Principe du marquage à l'annexine V / PI.</i>	94
<i>Figure 1.63 : Schéma simplifié du principe de la cytométrie en flux.</i>	94
<i>Figure 1.64 : Grandeurs physiques déterminées en cytométrie de flux et application aux leucocytes.</i>	95
<i>Figure 1.65: Exemple de résultat obtenu avec la méthode de l'annexine V couplée à l'iodure de propidium.</i>	95

Partie 2

<i>Figure 2.1 : Critère morphologiques d'identification des bourgeons des bourgeons.</i>	99
<i>Figure 2.2: Les bourgeons récoltés (A- RMB et B- SMB)</i>	99
<i>Figure 2.3: Bourgeons d'érables lyophilisés et broyés au mortier (A- RMB et B- SMB)</i>	100

Partie 3

<i>Figure 3.1: Résultats du criblage chimique des principales familles de composés naturels présents dans les extraits de bourgeons d'érables.</i>	116
<i>Figure 3.2: TLC fingerprinting of extracts from red and sugar maple buds.</i>	124
<i>Figure 3.3: Chemometric analysis of phenolic fingerprint of extracts from red and sugar maple buds.</i>	125

<i>Figure 3.4: Extraction yields of maple bud samples.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 3.5: The correlation circle of phenolic compound classes and the antioxidant capacity assays.....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 3.6 : Persistance de la mousse après agitation de l'extrait l'eau chaude de bourgeon d'érable à sucre.</i>	<i>144</i>
<i>Figure 3.7 : Activité hémolytique des extraits de bourgeons d'érable.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 3.8 : Profils chromatographique à 280 nm des extraits aqueux de bourgeons d'érable rouge (RMB) et d'érable à sucre.</i>	<i>147</i>
<i>Figure 3.9: Evaluation of antioxidant capacity of RMB hot water extract.</i>	<i>154</i>
<i>Figure 3.10: Separation of the phenolic compounds detected by HPLC in the RMB hot water extract.</i>	<i>155</i>
<i>Figure 3.11: Identification of phenolic compounds in the RMB hot water extract.</i>	<i>156</i>
<i>Figure 3.12: Effects of RMB hot water extract on neutrophil viability after a 24 h incubation.</i>	<i>161</i>
<i>Figure 3.13: The structure of five most abundant phenolic constituents of hot water extract from red maple extract.</i>	<i>181</i>
<i>Figure 3.14: Dose-response effect of red maple buds hot water extract (RMB-hwe) and its fractions on neutrophil viability</i>	<i>183</i>
<i>Figure 3.15: Phytochemical screening of fractions derived from RMB-hwe.....</i>	<i>183</i>
<i>Figure 3.16: Pro-apoptotic effect of major gallotannins from red maple buds hot water extract (RMB-hwe) and its fractions on human neutrophils.</i>	<i>184</i>
<i>Figure 3.17: Effect of the constant ratio combination of ginnalin A, ginnalin 3,6 and ginnalin C on neutrophils viability</i>	<i>185</i>

Partie 4

<i>Figure 4.1 : Aperçue de la démarche de recherche de molécules bioactives à partir de plante.</i>	<i>190</i>
<i>Figure 4.2 : Organisation phylogénétique des érables.</i>	<i>191</i>
<i>Figure 4.3 : Structure de la ginnaline A.....</i>	<i>194</i>
<i>Figure 4.4 : Exploration du contenu en protéines des extraits aqueux de bourgeons d'érables</i>	<i>199</i>

LISTE DES TABLEAUX

Partie 1

Tableau 1.1: Classification botanique des érables.....	6
Tableau 1.2: Quelques éléments botaniques de comparaison d'érable rouge et érable à sucre.....	7
Tableau 1.3: Les principales techniques de chromatographie utilisées en chimie des produits naturelles	39
Tableau 1.4: Caractéristique des détecteurs les plus utilisées en chromatographie liquide.....	44
Tableau 1.5: Liste des composés identifiés dans <i>Acer saccharum</i> (Érable à sucre)	49
Tableau 1.6: Nature des composés identifiés dans <i>Acer rubrum</i> (Érable rouge)	50
Tableau 1.7: Quelques exemples d'essais biologiques réalisés sur les 2 espèces d'érables.....	51
Tableau 1.8: Les espèces oxygénées réactives des milieux biologiques.....	52
Tableau 1.9: Avantages et limites rapportées pour certains tests chimiques.....	59
Tableau 1.10: Avantages et limites rapportées pour certains tests chimiques.....	67
Tableau 1.11: Les récepteurs des neutrophiles	81

Partie 2

Tableau 2.1: Composition des phases mobiles utilisées pour la migration des plaques de CCM.....	102
Tableau 2.2: Nature des réactifs de dérivation utilisés pour le criblage chimique des extraits de bourgeons d'érables.	103

Partie 3

Tableau 3.1 : Résultats des essais physicochimiques sur la matière végétale.....	111
Tableau 3.2 : Résultats du criblage chimique par CCM des extraits de bourgeons d'érables.....	115
Tableau 3.3: Evaluation of total phenolic content and others phenolic sub-classes.....	137
Tableau 3.4: Antioxidant capacity of maple bud extracts through DPPH and ORAC assays.....	139
Tableau 3.5: Pearson correlation coefficients between variables (quantities of each class of phenolic compounds and the antioxidant tests)	141
Tableau 3.6 : Exploration quantitative des principales familles de composés mis en évidence dans les bourgeons d'érables.	145
Tableau 3.7: Tentative structural assignment of major compounds present in hot water extract from red maple buds.	159
Tableau 3.8: Quantitative analysis of major compounds present in hot water extract from red maple buds.....	160
Tableau 3.9: Quantification of main phyto-constituents of red maple buds hot water crude extract and its fractions.....	186

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACGs	<i>Anhydroglucitol-core gallotannins</i>
ACP	<i>Analyse en Composante Principale</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDE	<i>Bond dissociation energy</i>
BF	<i>Butanol fraction</i>
BuOH	<i>Butanol</i>
CAE	<i>Chlorogenic acid equivalents</i>
CC	<i>Chromatographie sur colonne ouverte</i>
CCA	<i>Cellular capacity antioxidant</i>
CCC	<i>Chromatographie à contre-courant</i>
CCM	<i>Chromatographie sur couche mince</i>
CE	<i>Cathechin equivalent</i>
COZY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CPA	<i>Cellules présentatrices de l'antigène</i>
CPG	<i>Chromatographie de partage centrifuge</i>
CUPRAC	<i>Cupric ion-reducing antioxidant capacity</i>
DCM	<i>Dichlorométhane</i>
DMACA	<i>P-Dimethylaminocinnamaldehyde</i>
DMAPP	<i>Dimethylallyle diphosphate</i>
DPPH	<i>2,2'-azobis (2-methylpropionamide)-hydrochloride)</i>
EAF	<i>Ethyle acetate fraction</i>
ESI	<i>Electro-spray ionisation</i>
EthE	<i>Ethanol 95 extract</i>
EtOAc	<i>Ethyl acetate</i>
FA	<i>Formic acid</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FC	<i>Chromatographie flash</i>
FID	<i>Flamme ionization detector</i>
FPAQ	<i>Fédération des producteurs acéricoles du Québec</i>
GAE	<i>Gallic acid equivalents</i>
GC	<i>Chromatographie en phase gazeuse</i>
GRAFE	<i>Galactose, rhamnose, arabinose fructose equivalent</i>
HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>High performance thin-layer chromatography</i>
HR-MS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
HSCCC	<i>High speed counter-current chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HWE	<i>Hot water extract</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IPP	<i>Isopentanyl diphosphate</i>
LOD	<i>Limits of detection</i>
LOQ	<i>Limits of quantification</i>

MAP Kinases	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MeOH	<i>Methanol</i>
MICI	<i>Maladies inflammatoires chroniques intestinales</i>
MPO	<i>Myéloperoxydase</i>
MS	<i>Spectrométrie de masse</i>
Nf-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect spectroscopy</i>
NP/PEG	<i>Natural products/polyethylene glycol</i>
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthase</i>
ORAC	<i>Oxygen radical assay capacity</i>
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
PI	<i>Iodure de propidium.</i>
PKS	<i>Polyketides synthases</i>
PMN	<i>Polymorphonucléaires</i>
PSN	<i>Produits de santé naturels</i>
QE	<i>Quercetin equivalents</i>
RM	<i>Red maple</i>
RMB	<i>Red maple Buds</i>
RMB-hwe	<i>Hot water extract from red maple buds</i>
RMN	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSC	<i>Radical scavenging capacity</i>
RWF	<i>Remaining water fraction</i>
SAR	<i>Structure-activity relationship</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SET	<i>Single electron transfer</i>
SM	<i>Sugar maple</i>
SMB	<i>Sugar maple Buds</i>
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>
TEq	<i>Trolox equivalents</i>
TFC	<i>Total flavonoids contents</i>
THA	<i>Total hydroxycinnamic acids</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TMA	<i>Total monomeric anthocyanins</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptors</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
TPC	<i>Total phenols contents</i>
UPLC	<i>Chromatographie Liquide ultra Performance</i>
UV	<i>Ultraviolette</i>
Vis	<i>Visible</i>

*« Vis comme si tu devais mourir demain. Apprends comme si tu devais vivre toujours »
« Soyez le changement que vous voulez voir dans le monde. »
(Gandhi)*

*In memoriam
A toi Papy qui nous a toujours inculqué cette philosophie du travail bien fait en toute circonstance
A Cedric CAPACCI, mon éternel colloc
Au Dr Jean Marie SAWADOGO, une source d'inspiration*

REMERCIEMENTS

À mes encadrants et évaluateurs

À la professeure STEVANOVIC : Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour l'accueil au sein de votre équipe de recherche et pour votre accompagnement dans la réalisation de ce projet. Je vous suis reconnaissant pour l'ensemble de la formation et pour l'apport de votre expertise en chimie du bois.

Au professeur POUBELLE : Merci d'avoir partagé avec moi votre grande expérience et votre rigueur scientifique. Votre disponibilité, votre enthousiasme pour la recherche et vos précieux conseils ont grandement contribué à bonifier ce travail.

Aux professeurs RATI, SOMÉ et FORTIN membres de ce jury de thèse, je vous exprime toute ma gratitude pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail.

Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet

Aux partenaires financiers : Je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), *Levaco Inc.* et *Decacer Inc.* pour le financement accordé au projet de recherche

À l'ensemble du personnel du CRMR et en particulier à Yves, Guylaine et Marthe, je vous suis particulièrement reconnaissant pour votre disponibilité et votre support.

Aux membres de mon équipe de recherche

Merci Pierre pour ton aide et ta disponibilité lors de mes premiers pas au laboratoire.

Merci à Shyam, Sarah, Marine et Alex pour votre support exceptionnel. Ce fut un réel plaisir de travailler avec chacun de vous sur les différents aspects de mon projet.

À Nellie, Thibaud et Sagar, mes collègues devenus ma seconde famille, je tiens à vous dire merci pour tous ces moments de travail, d'encouragement pendant les moments de doute, mais également pour les fous rires au bureau et les folies en soirée. Je vous souhaite à chacun le meilleur pour la suite. Vous allez me manquer ... ☺

À mes collaborateurs des autres centres de recherche (CRRI, INAF et CERMA)

Merci aux professeurs Fernandes, Peltier et Bourgoin pour l'accueil au sein de leur équipe.

À Jouda, Isabelle, Julie-Christine, Diane et Mr Audet, merci pour la disponibilité et la précieuse assistance lors de mes différentes sollicitations.

A ma famille

Encore un grand merci à maman et à papa pour les prières, le soutien, les conseils et les encouragements.

Merci aussi à mes frères et sœurs pour tout. À maman Hoté, Alix et Alex, je vous dis merci pour ces beaux moments à Ottawa. À toi Carine, merci de ta présence et pour ton soutien indéfectible.

Aux amis

De Québec : Merci à Léa (Mme Geoffroy☺) et à Caro pour ces séances de foot et de basket ... À mes colocos qui ont tant souffert de m'entendre parler des bourgeons d'érables (Maxoubeu et madame Delangie, Erwan, Romain) merci de m'avoir soutenu et supporté. A Nini, Astou et Vanessa, merci pour vos encouragements.

De Ouagadougou : À Befa et madame Sanwidi merci vos appels et vos encouragements. A mes mentors, Dr Kinda, Dr Gnoula, José et Tantie Coulibaly, merci pour vos conseils et vos encouragements.

De France : À Valerie, Guy, Mathieu (merci pour les corrections) et à mes « Nassara », Gui Gui, Gégé et Manon (la poutine te manque pas trop ?), merci pour vos appels et votre soutien.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Sciences du Bois pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.). Les travaux de recherche ont été menés dans le cadre du projet de valorisation de l'écorce et des bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge, financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les partenaires industriels *Décacer* et *Levaco Inc.* Professeure Tatjana STEVANOVIC, investigatrice principale du projet et directrice de recherche, a supervisé l'ensemble de ces travaux multidisciplinaires qui se sont déroulés au Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR au département des sciences du bois et de la forêt), à l'Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF) et au Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés (CERMA). Professeur Patrice E. POUBELLE, en sa qualité de co-directeur de recherche, a dirigé les expériences de criblage d'activités biologiques qui se sont déroulés au Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie (CRI) du Centre de Recherche du CHU de Québec, au Département de Médecine de l'Université Laval.

Les résultats des différentes approches ont été rédigés sous formes d'articles scientifiques et présentés conformément aux règles de préparation de thèses de la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université Laval.

La *première partie* de cette thèse fait un état de l'art à travers une revue de la littérature qui présente d'abord l'intérêt de travailler sur des bourgeons d'érables (*chapitre 1*). Ensuite les produits naturels, les différentes méthodes utilisées pour les obtenir et les méthodes d'explorations chimiques utilisées pour les identifier sont présentés (*Chapitre 2*). Enfin l'oxydation en milieu biologique qui conduit au stress oxydant (*chapitre 3*) et un aperçu du rôle des neutrophiles dans la réponse immunitaire (*chapitre 4*) complètent cette partie introductive qui permet de cerner les enjeux de notre démarche.

La *seconde partie* de ce manuscrit fait une synthèse de l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées au cours de nos divers travaux grâce à une présentation des matières végétales étudiées (*chapitre 1*) et des différentes méthodes d'explorations chimiques et biologiques (*chapitre 2*).

Dans une *troisième partie*, les résultats majeurs de notre étude ont été rapportés dans 5 chapitres intitulés *Résultat 1 à 5*.

Les *Résultats 1* résument les contrôles réalisés sur les matières végétales en vue de s'assurer de leur qualité avant le début des expériences d'explorations chimiques.

Les *Résultats 2* font un bilan de la nature des familles de composés naturels que l'on peut retrouver dans des extraits aqueux et hydro-alcoolique 95%(v/v) de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge. Une partie de

ces résultats ont été publiés comme **article 1** dans *Austin Biochemistry 2017; 2(1): 1009* sous le titre : «*Chemometrics-based approach to analysis of phenolic fingerprints of red and sugar maple bud extracts*».

Les **Résultats 3** rapportent l'évaluation quantitative réalisée sur les principales familles de composés naturels précédemment mis en évidence dans les extraits de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge. Une partie de ces résultats a également fait l'objet d'une publication (**Article 2**) dans *Current Topics in Phytochemistry 2016, Vol. 13, Pages 69 – 78* sous le titre : «*Investigation of extracts from red and sugar maple buds as potential source of antioxidant phytochemicals.*».

Les **Résultats 4** révèlent la nature chimique des composés phénoliques présents dans les extraits à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge et les résultats de l'évaluation de sa capacité antioxydante et de sa toxicité. Ces résultats ont constitué l'**article 3** publié dans *Chemistry and biodiversity 2017 Jun;14(6). doi:10.1002/cbdv.201700028* sous le titre : «*Antioxidant capacity, phenolic constituents and toxicity of hot water extract from red maple buds*».

Les **Résultats 5** apportent les preuves que les gallotanins d'érable rouge sont à l'origine d'un effet pro-apoptotique sur les neutrophiles humains. L'**article 4** en cours de préparation prendra en compte ces résultats.

Enfin la **quatrième partie** de ce document fournit une discussion générale des résultats obtenus, tire des conclusions majeures de nos travaux et formule des perspectives de recherches qui pourraient conduire à la valorisation d'extraits de bourgeons d'érables.

Aussi, les résultats de ce projet de doctorat ont également été présentés sous formes de posters lors des conférences et congrès suivants :

1. **N. R. Meda**, T. Stevanovic and P. Poubelle. *Bio-guided study of the pro-apoptotic effect of red maple bud phytoconstituents on human blood neutrophil*. "In Trends in natural product research – pse young scientists" phytochemical society of Europe (PSE), Lille, France (28 juin -1 juillet 2017).

2. **N. R. Meda**, T. Stevanovic and P. Poubelle. *Bio-guided study of the pro-apoptotic effect of red maple bud phytoconstituents on human blood neutrophil*. "In Les Journées de la recherche CHU de Québec-Université Laval ", Québec, Canada (24 et 25 mai 2017).

3- **N. R. Meda**, M. Rott, S. Suwal, P. Poubelle and T. Stevanovic. Buds of sugar and red maples: potential source of bioactive ingredients. "In symposium des étudiants de l'INAF Québec, CANADA (28 Avril 2016).

4- **N. R. Meda**, M. Rott, S. Suwal, P. Poubelle, et T. Stevanovic. *Empreintes chimiques de bourgeons d'érables*. In : "colloque annuel du CRMR", Québec, Canada (28 Octobre 2015).

Enfin pour toutes les expériences au laboratoire qui ont conduit aux différents résultats, j'ai conçu, planifié et réalisé personnellement l'ensemble des activités de recherche sur la base des données disponibles

dans la littérature et/ou suggestions de mes directeurs de recherche. J'ai également assuré la collecte des données, leur interprétation et la rédaction des manuscrits. Les Pr. STEVANOVIC et POUBELLE ont encadré l'ensemble des travaux en ce qui concerne la conception expérimentale. Ils ont également participé à l'interprétation des résultats et, à la révision et correction des manuscrits publiés. Dr. Shyam SUWAL, stagiaire post-doctoral et co-auteur des articles 1 et 2 a participé à la planification expérimentale, à l'interprétation des résultats et à la correction des manuscrits correspondants. Marine ROTT, stagiaire DUT et co-auteur des articles 1 et 2, a participé à la réalisation des expériences en question et à leur interprétation.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tous les organismes vivants sont constitués de centaines de milliers de molécules, chacun produisant son propre mélange caractéristique. L'ensemble de ces composés organiques d'origine naturelle sont regroupés sous l'appellation « produits naturels » (Firn, 2009). Ainsi, les organismes entiers (plantes, microorganismes, animaux), les parties d'organismes (organe animal, fleur, feuille, racine), les extraits d'organismes et les composés purs isolés d'organismes sont considérés comme des « produits naturels » (Sarker et Nahar, 2012a). À travers l'histoire et les civilisations, l'homme s'est toujours reposé sur la nature et explore en continu son potentiel afin d'améliorer divers aspects de son existence. Sous forme d'épices, d'arômes, de parfums, de colorants et même de médicaments, les produits naturels font partie intégrante de notre quotidien. On estime encore aujourd'hui qu'une grande majorité de la population mondiale (65% de façon globale et près de 80% dans les pays en voie de développement) utilise encore des produits à base de plantes comme remèdes pour leurs soins de santé primaires (Cragg et Newman, 2013).

Au cours du XX^{ème} siècle, la plupart des grandes multinationales pharmaceutiques avaient massivement réduit leurs investissements dans la recherche sur les produits naturels. Mais ces dernières décennies ont été marquées par un regain rapporté par les littératures scientifiques et populaires qui a contribué à l'émergence d'un élan visant à approfondir les connaissances scientifiques sur la nature, et le monde végétal en particulier. Plusieurs raisons concourent à expliquer ces initiatives.

D'abord les produits naturels sont largement considérés comme plus sains, plus sûrs, plus respectueux de l'environnement et parfois meilleurs que les produits synthétiques (plastiques, essence, pesticides et médicaments de synthèse). Ensuite, l'apparition de diverses formes de résistance aux antibiotiques et aux médicaments contre le cancer a souligné la nécessité de trouver de nouvelles sources d'inspiration pour la production de nouveaux médicaments. Or, la nature offre une diversité chimique incomparable qui est la conséquence de sa biodiversité extraordinaire. En effet notre planète abrite d'énormes quantités de biodiversité, mais la grande majorité n'a pas encore été étudiée ni même découverte. Il existe des descriptions taxonomiques reconnues pour environ 300 000 plantes terrestres et environ 1,9 million d'espèces animales. En comparaison, le nombre total d'espèces végétales sur terre est estimé à plus de 450 000, et le nombre d'espèces d'insectes à elles seules est compris entre 5 et 6 millions. Les estimations de la diversité totale des eucaryotes suggérées par divers modèles vont de 2 à 100 millions, certains suggérant même qu'aucune estimation n'est réaliste étant donné notre état incomplet des connaissances, en particulier en ce qui concerne la diversité des champignons et des insectes (Naman, Leber et Gerwick, 2017). Malgré les études intensives réalisées sur la flore terrestre, on estime qu'à peine 6% des plantes ont été étudiées pour leur effet pharmacologique et seulement 15% pour leur composition chimique (Cragg et Newman, 2013).

De plus, les structures chimiques provenant de ces organismes présentent la particularité d'être très complexes au niveau architectural (groupements fonctionnels et stéréochimie). Enfin, les composés fabriqués par ces organismes présentent déjà des activités biologiques (*drug like*) car ils sont produits par ces derniers pour communiquer dans leur environnement (présence de cibles moléculaires chez des organismes). Ainsi,

partout dans le monde de vastes programmes de recherche sur les produits naturels ont vu le jour et se poursuivent. On estime aujourd'hui que plus de la moitié des nouvelles entités chimiques découverte est inspirée par la nature (Cragg et Newman, 2013).

Au niveau de la biomasse forestière, de nombreuses études ont indiqué la présence d'une grande diversité de molécules bioactives. Ce sont par exemple des diarylheptanoïdes de bouleau (*Betula papyrifera*) (Diouf, Stevanovic et Boutin, 2009; Mshvildadze, Legault, Lavoie, Gauthier et Pichette, 2007), les diterpènes de mélèze (*Larix laricina*) (Shang et al., 2012), les composées phénoliques de peuplier (*Populus sp.*) (Dudonné et al., 2011; Pichette et al., 2010) et d'épinette (*Picea mariana*) (García-Pérez et al., 2014), des sesquiterpènes de sapin (*Abies balsamea*) (Pichette, Larouche, Lebrun et Legault, 2006) et de thuya (*Thuja occidentalis*) (Chang et al., 2000), et des gallotanins d'érables (*Acer rubrum*) (González-Sarriás, Yuan et Seeram, 2012; Royer, Diouf et Stevanovic, 2011).

Le Canada possède plus de 300 millions d'hectares de forêts qui représentent également près de 10% de la couverture forestière de la planète. Composées essentiellement de résineux (68 %), les forêts canadiennes contiennent environ 180 espèces d'arbres. Cette immense biomasse forestière est essentiellement transformée en produits forestiers traditionnels comme le bois d'œuvre et le papier (R. naturelles C. Gouvernement du Canada, 2016). Utilisés pendant longtemps pour produire de l'énergie, les résidus de cette activité industrielle sont estimés à près de 20 millions de tonnes de matière sèche par an et font maintenant l'objet de valorisation pour le développement de nouveaux bioproduits renouvelables et totalement novateurs, avec des retombées financières considérables (Cambero, Sowlati, Marinescu et Röser, 2015). Les résidus ou certains sous-produits laissés par les procédés de fabrication et les résidus de récolte sont utilisés pour la production de biomatériaux et d'entités chimiques pour les secteurs de la chimie, du textile et de la pharmacie. Face à la potentielle croissance et à l'importance de ce marché, l'utilisation des résidus de transformation a été notamment proposée comme source de molécules bioactives pour de nombreuses applications (R. naturelles C. Gouvernement du Canada, 2016).

Parmi ces résidus, les écorces issues de l'écorçage des troncs occupent une part importante des initiatives proposées à ce jour. Pourtant, les branches des arbres éliminées durant des éclaircies de peuplements forestiers ou pendant les campagnes d'élagage portent également d'autres tissus végétaux dont la composition chimique et les propriétés biologiques peuvent s'avérer distinctes des écorces. Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'évaluer le potentiel de bourgeons d'érables à sucre et d'érable rouge à fournir des ingrédients actifs valorisables en thérapeutiques, nutraceutiques ou cosmétiques. Ces tissus végétaux présentent la particularité de posséder des cellules de méristème (cellules souches végétales) qui pourraient contenir des molécules particulières et différentes de celles décrites précédemment dans les feuilles ou l'écorce. Notre projet de recherche a donc eu pour principal objectif, l'exploration des domaines potentiels de valorisation de produits naturels issus d'extraits de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge, en fonction de leur contenu chimique et des propriétés biologiques qu'ils pourraient présenter.

De tels objectifs de recherche impliquent de connaître la législation sur l'utilisation des produits naturels qui a connu de profonds changements ces dernières années. Longtemps distingués des médicaments parce qu'ils provenaient pour la plupart des éléments de l'alimentation humaine, les compléments alimentaires, nutraceutiques, aliments fonctionnels ou alicaments sont actuellement sous les projecteurs des organes de législation un peu partout en Europe, aux États Unis ou au Canada (Le et Pathak, 2011). En effet, ces préparations contiennent des concentrations élevées en métabolites complètement différentes de celles que l'on retrouve dans nos assiettes. Ainsi, des preuves qualitatives et quantitatives de sécurité d'emploi sont de plus en plus requises (Swann, 2016). Au Canada la réglementation sur les produits de santé naturels (PSN) est entrée en vigueur le 1er janvier 2004 et établit ces produits comme un sous-ensemble de médicaments. Parmi les exigences établies par Santé Canada, figure un examen préalable à la mise sur le marché et l'approbation de la sécurité, de l'efficacité, des allégations et de la spécification du produit effectuée par la direction des produits de santé naturels et sans ordonnance (DPSNSO). Ainsi, suppléments en vitamines et minéraux, les remèdes à base d'herbes et de plantes, les médicaments traditionnels (comme les médicaments traditionnels chinois et les médicaments ayurvédiques), les probiotiques et les produits homéopathiques reçoivent une licence de mise en marché de Santé Canada (S. C. Gouvernement du Canada, 2012). Les expériences réalisées dans le cadre de cette étude ont donc été conduites en tenant compte de ces différentes exigences pour la valorisation de produits naturels issus de bourgeons d'érable.

**PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE ET
OBJECTIF DE RECHERCHE**

Je n'ai pas de talents particuliers. Je suis juste passionnément curieux
Albert Einstein

CHAPITRE 1 : LES ERABLES ET LEURS BOURGEONS

1 Érable à sucre et érable rouge

1.1 Taxonomique des érables

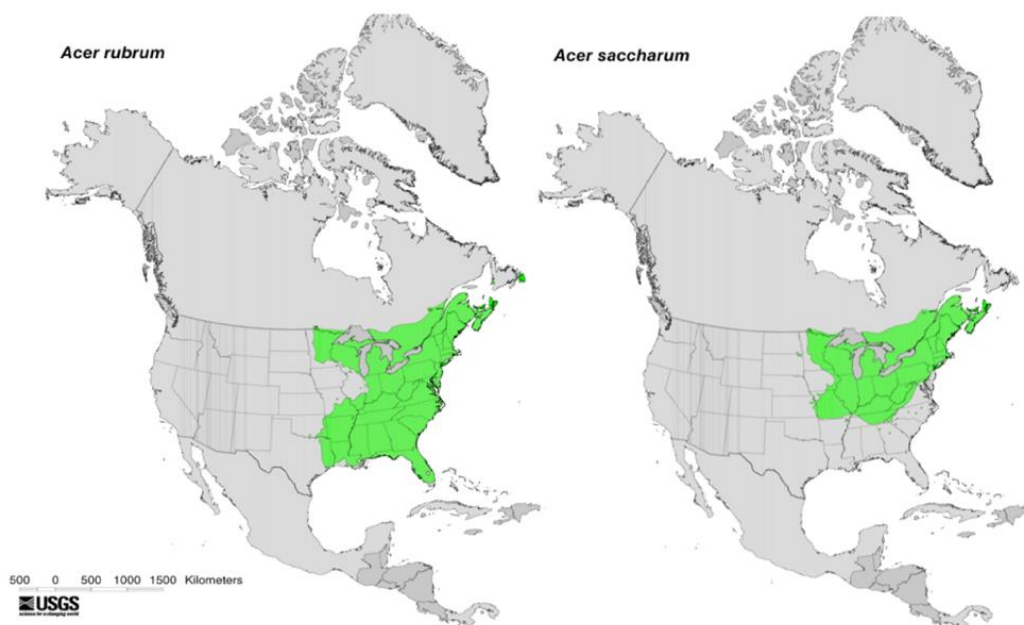
Les érables, regroupés dans le genre *Acer*, appartiennent à la famille des Sapindacées d'après la dernière classification phylogénétique de 2009 (APG III, Angiosperm Phylogeny Group) (Bremer et al., 2009) (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1: Classification botanique des érables

Clade	Angiospermes
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	Sapindaceae
Sous-famille	Sapindoideae
Genre	<i>Acer</i>

1.2 Répartition géographique

Environ 150 espèces d'érables ont été recensées et se répartissent essentiellement dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (Anseau et Bernier, 1995). L'érable à sucre et l'érable rouge font partie des 30 espèces originaires du continent Nord-américain (**Figure 1.1**) et leurs feuilles sont responsables de l'essentiel de la coloration rouge et orange de l'automne (Apostolidis *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2012b).




Adapté de (« Digital representation of tree species range maps from “Atlas of United States trees” by Elbert L. Little, Jr. (and other publications) », 2017) 

Figure 1.1 : Répartition géographique des essences de notre étude

1.3 Description botanique

Les érables sont des arbres pouvant atteindre jusqu'à 40 mètres de hauteur, au tronc long et droit en forêt, à cime courte, étroite, formée de branches verticales. Ils possèdent des feuilles simples et lobées, généralement caduques. Les fleurs des érables sont de forme régulière (actinomorphes) avec cinq (5) sépales, cinq (5) pétales, huit (8) étamines et un pistil contenant deux carpelles soudés et biovulés. Pendantes ou dressées, elles peuvent être hermaphrodites (mâle et femelle à la fois) ou unisexuées. Chez la majorité des érables la pollinisation est entomophile et les fruits sont en disamares (Marie-Victorin, Brouillet, Rouleau, Goulet et Hay, 2002).

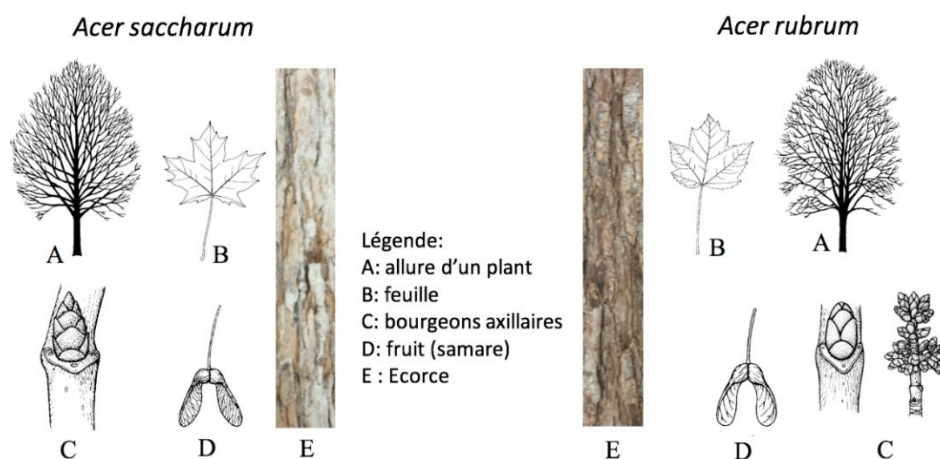


Figure réalisée à partir des données obtenues chez Ressources naturelles Canada <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/86> et <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/84>

Figure 1.2: Caractères morphologiques des essences de notre étude.

La **Figure 1.2** présente les caractères morphologiques des essences concernées par notre étude. Les éléments de botanique pouvant permettre de différencier les deux espèces ont été résumés dans le **tableau 1.2**.

Tableau 1.2 : Quelques éléments botaniques de comparaison d'érable rouge et érable à sucre

Critères	<i>Acer saccharum</i> Marsh.	<i>Acer rubrum</i> L.
Écorce	Grisâtre	Brun rougeâtre
Feuilles	Lobes larges d'apparence rectangulaire Automne : jaune orangé à rouge	Larges et dentés Automne : rouge vif à orangées, très attrayantes
Fleurs	Apparaissent en même temps que les feuilles, jaunâtres	Précédant les feuilles, d'un rouge vif
Rameaux	Brun rougeâtre luisant à verts, glabres	Rameaux et bourgeons rouges
Bourgeons	Pointus, brun moyen à brun foncé ; 6 à 8 paires d'écaillés peu pubescentes	Grappes de bourgeons, Paires d'écaillés arrondies, luisantes, rougeâtres, lisses

1.4 Utilisations rapportées de ces essences

En plus de leur aspect ornemental, les érables sont couramment utilisés pour la confection de produits mobiliers et de bois d'œuvre. En effet, le mot Acer vient du celte *ac*, qui signifie dur, faisant référence à la dureté du bois. En effet, le bois des essences appartenant à ce genre est prisé dans l'industrie forestière et en ébénisterie. L'érable à sucre particulièrement, produit un bois dur et lourd utilisé pour la fabrication de meubles, de parquets, de boiseries, de contreplaqués et de menus articles.

Les érables sont également des arbres à sève. La sève d'érable, qui coule abondamment au printemps lorsque les températures journalières sont positives est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la production du sirop d'érable. Ce sirop est un édulcorant naturel de grande consommation et le plus grand produit alimentaire disponible totalement dérivé de la sève. Selon la fédération des producteurs acéricoles du Québec (FPAQ), le Québec comptait en 2016 près de 13 500 producteurs regroupés en plus de 7000 entreprises (Fédération des producteurs acéricoles du Québec, 2017). Pour la même année, ce rapport précise que la valeur des produits de l'érable à la ferme était estimée à plus de 400 millions de dollars et que le Québec à lui seul avait assuré 92.0 % de la production canadienne, soit 71.4% de la production mondiale. En plus de son impact économique, la production de sirop est d'une grande importance culturelle pour cette région du monde (Apostolidis *et al.*, 2012). L'érable à sucre et l'érable rouge qui font l'objet de notre étude font partie des trois essences utilisées pour la production du sirop d'érable.

Enfin la littérature rapporte que certaines espèces d'érables ont été largement utilisées comme plante médicinale par les Amérindiens, particulièrement sous forme d'infusion et de décoction d'écorces pour traiter diverses douleurs et maladies (Wan *et al.*, 2012). Ces infusions et décoctions soignaient les yeux endoloris (y compris la cataracte), les affections pulmonaires (bronchites, essoufflement, rhume et toux), digestives (obstructions hépatiques, diarrhée), les troubles gynécologiques et soulageaient les crampes (Arnason, Hebda et Johns, 1981).

2. Les bourgeons et la dormance

Les plantes pérennes se caractérisent par leur capacité à suspendre et reprendre leur croissance selon la saison en réponse à l'environnement. À la fin de l'été, l'arbre met en place de nouveaux bourgeons, qui ne s'ouvriront qu'au printemps suivant (Vitasse, 2009).

Les bourgeons assurent la croissance de la plante et permettent la ramification des tiges. Ils assurent également à la plante une sécurité de repousse et de reproduction quand les conditions environnementales sont plus adéquates (Horvath, 2010; Horvath *et al.*, 2003).

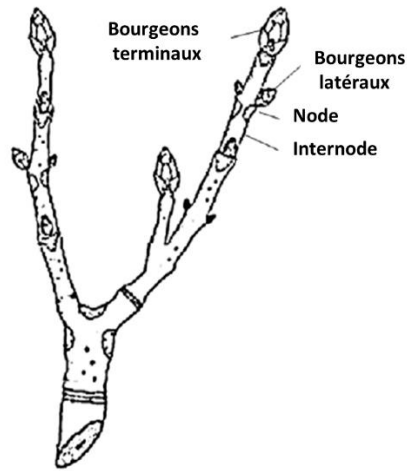
2.1 Les différents types de bourgeons

Selon leur position sur la tige ou sur les branches, on distingue (**Figure 1.3**):

- ❖ les bourgeons terminaux ou apicaux qui sont situés à l'extrémité de la tige ou des branches. Ils sont responsables de la croissance en hauteur des structures qui les portent.

- ❖ les bourgeons latéraux qui peuvent être
 - axillaires si situés à la base de certaines feuilles.
 - adventifs si formés ailleurs qu'à la base des feuilles (sur la tige ou les racines par exemple).

Les bourgeons latéraux seront à l'origine de la formation de ramifications latérales (nouvelles branches) qui porteront des feuilles et/ou des fleurs. Les bourgeons terminaux exercent une inhibition de la croissance des bourgeons latéraux par sécrétion d'auxine, concentrant ainsi la croissance de la plante plutôt vers le haut (Anderson *et al.*, 2001; Dirr, 2009; Jones and Wofford, 2014).

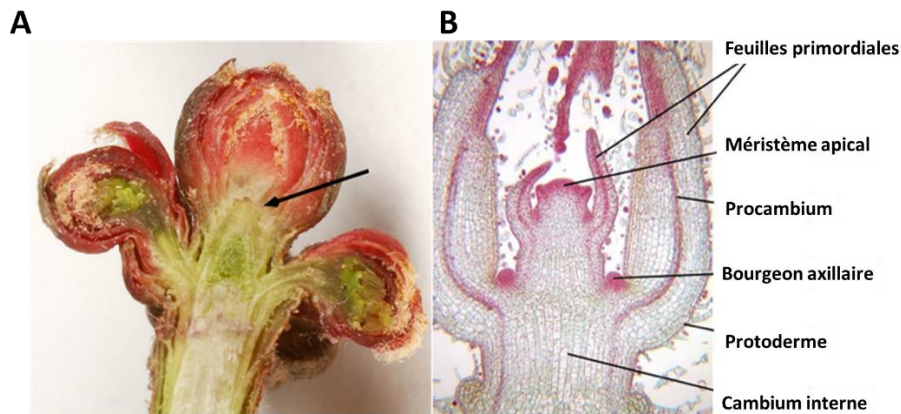


Adaptée de Brukhin et Morozova (2011) ©

Figure 1.3: Organisation des bourgeons sur une tige,

2.2 Structure du bourgeon

Un bourgeon est une branche embryonnaire. Il est formé par la répétition d'unité appelée phytomère. Un phytomère est constitué d'un nœud, d'un entre-nœud et d'une petite feuille rudimentaire portant un bourgeon axillaire (dont l'ensemble forme le *primordium* foliaire) (**Figure 1.4**).



Adapté de Mark (2013) ©

A- Coupe longitudinale d'un bourgeon avec mise en évidence des tissus de méristème
B- Aspect microscopique des différentes structures du bourgeon

Figure 1.4: Coupe longitudinale et structure d'un bourgeon

Le méristème apical au sommet du bourgeon est à l'origine des divisions cellulaires, de la croissance, de l'expansion et de la maturation des branches. L'ensemble peut être recouvert ou non par des écailles (Berg, 2007; Pallardy, 2010; Raven *et al.*, 2000).

2.3 La dormance

A l'approche de l'hiver, les végétaux diminuent progressivement leur croissance et mettent en place des stratégies de résistance au froid. Ceci se caractérise par l'arrêt de la croissance, la sénescence et l'abscission foliaire puis l'entrée en dormance des bourgeons. La dormance peut se définir comme une suspension temporaire de la croissance visible, de toute structure végétale comportant un méristème (cambium et bourgeons), même en conditions environnementales favorables (Charrier, 2011).

2.3.1 Les différents types de dormance

La littérature décrit plusieurs types de dormance qui peuvent être considérés comme des étapes de sortie de dormance (Anderson *et al.*, 2001; Charrier, 2011; Horvath *et al.*, 2003; Vitasse, 2009). Ce sont :

- ❖ La paradormance qui correspond à une inhibition de croissance due à un autre organe de la plante, distinct et éloigné du tissu dormant (exemple : inhibition des bourgeons axillaires par le méristème apical ou par la présence des feuilles)
- ❖ L'endodormance aussi appelée dormance au sens strict. L'inhibition de croissance est liée à des facteurs endogènes au tissu dormant. Même en présence de conditions favorables, la croissance demeure impossible durant ce stade. Cette dormance serait initiée par la réduction de la photopériode qui a lieu en automne. La levée de l'endodormance a lieu lorsqu'une quantité suffisante de températures froides (appelée « *chilling temperatures* ») a été atteinte.
- ❖ Ecodormance : Cette phase est encore appelée phase de quiescence car elle se limite aux conditions environnementales et essentiellement à la température. A ce stade, la croissance devient possible dès que les conditions climatiques deviennent favorables. La croissance du bourgeon n'aura lieu que lorsqu'une quantité suffisante de chaleur soit accumulée (appelée « *forcing temperatures* »).

Le développement morphologique du bourgeon, se termine avec l'émergence des feuilles. Durant cette période, les cellules méristématiques des bourgeons sont en phase de croissance cellulaire intense. Puis, une fois les nouveaux tissus formés, leur état d'hydratation augmente fortement, les nouvelles feuilles se gonflent jusqu'à écarter les écailles protectrices autour du bourgeon.

2.3.2 Régulation de la dormance

La régulation de la dormance des bourgeons végétatifs est un processus complexe. Dans les méristèmes, plusieurs gènes et des voies de signalisation seraient impliqués dans le contrôle de la dormance des bourgeons et de la division cellulaire à l'origine de l'initiation et la formation des organes chez les plantes (Horvath *et al.*, 2003).

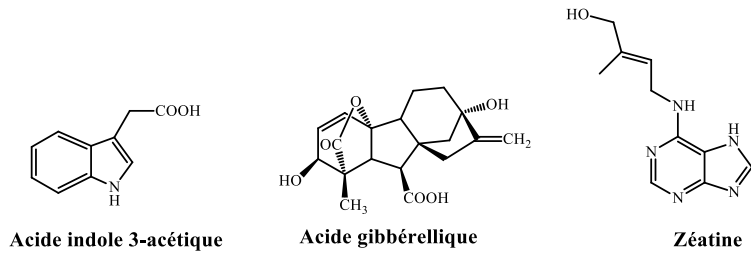
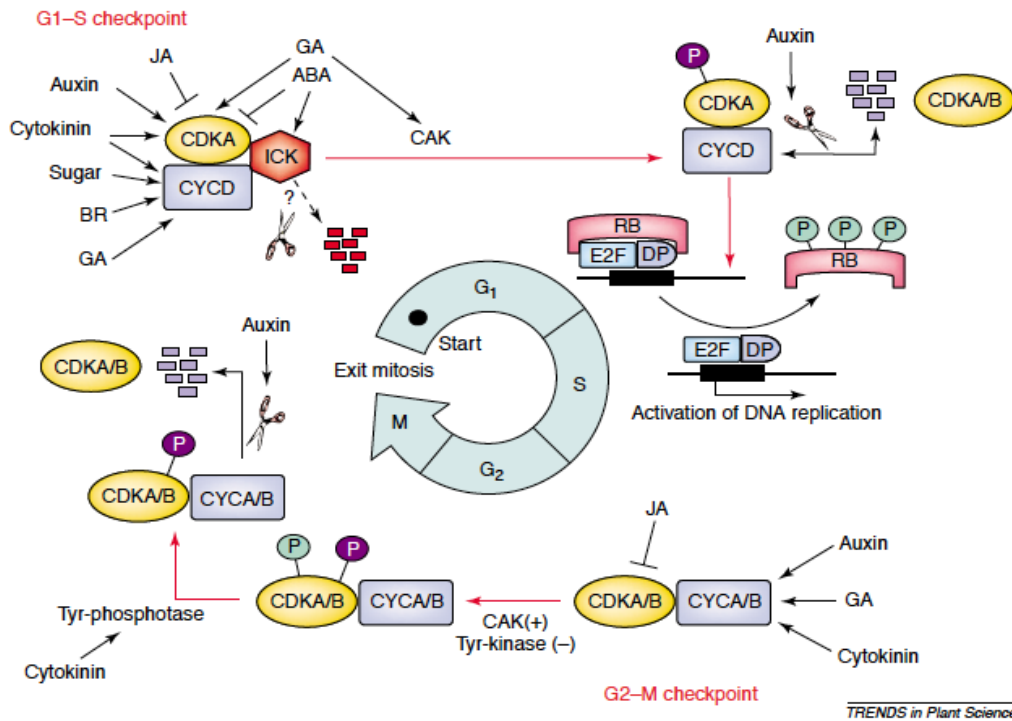


Figure 1.5: Exemples d'hormones végétales.

Les facteurs à l'origine de la sortie de la dormance sont de deux natures. D'une part, ce sont les facteurs environnementaux comme la température, la durée du jour, la qualité et la quantité de lumière, la disponibilité en nutriments et en eau. D'autre part, des signaux dits internes qui résultent de variations en hormones de croissance (**Figure 1.5**) comme les auxines (acide indole 3-acétique, IAA), les gibbérellines (acide gibbérellique, GA3), les cytokinines (zéatine) et les brassinostéroïdes (brassinolide) qui régulent la sortie de dormance, la croissance et la différenciation en divers organes.

Au niveau moléculaire, ces facteurs agissent également via des voies de transduction spécifiques et très complexes (**Figure 1.6**) pour réguler l'endo-, l'éco- et la para-dormance (Horvath, 2010).



Adapté de Horvath et al. (2003) avec permissions de l'éditeur

Certains médiateurs impliqués seraient : des cyclines (A, B et D), des kinases cycline-dépendantes (CDK), des CDK protéines inhibitrices (ICK1 notamment), des kinases CDK-activation (CAK), la protéine du rétinoblastome (RB), le facteur de transcription E2F et la protéine d'amarrage (DP), le complexe de promotion de l'anaphase (APC), le complexe SCF (SKP1-Cullin-F-box-protéines). Brassinostéroïdes (BR), acide gibbérellique (GA), acide abscissique (ABA) et acide jasmonique (JA).

Figure 1.6: Modèle de régulation de la sortie de dormance.

CHAPITRE 2 : LES EXTRACTIBLES DE PRODUITS NATURELS

Tous les organismes vivants transforment et convertissent un grand nombre de composés organiques pour assurer leur survie, leur croissance et leur reproduction. L'ensemble des composés provenant de leur métabolisme est souvent regroupé sous la terminologie « produits naturels ».

1. Généralité sur les extractibles

Sous la terminologie « extractible », on regroupe l'ensemble de ces molécules naturelles pouvant être récupérées à l'aide d'un solvant approprié. Les solvants utilisés sont généralement de nature organique ou de l'eau et plusieurs types de procédés d'extraction peuvent être utilisés comme nous le verrons dans le prochain paragraphe. La nature des extractibles obtenue est donc fonction à la fois du solvant d'extraction et de la méthode utilisée (Stevanovic et Perrin, 2009) .

1.1 Les principales familles de produits naturels

La multitude de composés synthétisés par les organismes vivants est classée en métabolites primaires et métabolites secondaires, bien que les limites précises entre ces deux groupes restent confuses. Les métabolites primaires sont définis comme des composés d'une importance cruciale à la vie des organismes qui les produisent. Ils sont donc associés à des fonctions vitales comme la photosynthèse, la respiration, la croissance et le développement. Il s'agit des lipides, des glucides, des protéines et des acides nucléiques. En dépit des caractéristiques très variées des organismes vivants, les voies du métabolisme primaire sont essentiellement les mêmes dans tous les organismes, en dehors des quelques variations mineures. La dégradation des glucides par glycolyse et par le cycle de Krebs / acide citrique /cycle des acides tricarboxyliques, la β - oxydation des acides gras ou la phosphorylation oxydative sont des exemples de voies du métabolisme primaire (Dewick, 2001).

Contrairement à ces voies du métabolisme primaire, il existe un domaine du métabolisme qui concerne des composés dont la distribution est beaucoup plus limitée dans la nature. Ce sont les métabolites secondaires qui s'accumulent en concentrations étonnamment élevées dans des organismes spécifiques, ou groupes d'organismes, et représentent l'expression de l'individualité des espèces. Ils peuvent donc servir aux études chimio-taxonomiques. Ces métabolites sont donc issus de voies de synthèse spécifiques, faisant intervenir des acteurs spécifiques dans ces organismes. La chimie des produits naturels fait généralement référence à l'étude de ces métabolites secondaires et des voies métaboliques associés (Dewick, 2001). Ignorées pendant longtemps, leurs fonctions dans les organismes attirent aujourd'hui l'attention. Dans le règne végétal qui nous intéresse ici, certains semblent avoir un rôle clé de protection (contre les herbivores, les infections microbiennes et les rayonnements UV) et d'attraction de pollinisateurs (agents allélopathiques). Ce sont donc des molécules pharmacologiquement actives qui suscitent l'intérêt dans divers domaines et peuvent être des sources potentielles de médicaments (Crozier, Clifford et Ashihara, 2006).

Cette dichotomie entre les métabolites primaires et secondaires tend à être de plus en plus remise en question. Par exemple, la gibbérelline A1 doit-elle être classée parmi les métabolites secondaires parce qu'elle est issue de la voie des isoprénoïdes ou parmi les métabolites primaires parce qu'elle joue un rôle essentiel d'hormone de croissance dans la régulation endogène ? Ainsi, des auteurs comme Firn et Jones (2009) proposent une classification des métabolites qui prend en compte le caractère évolutif des organismes.

En ce qui concerne notre étude, nous avons choisi de présenter les principales familles de produits naturels en fonction de leur origine biosynthétique.

1.1.1 Les glucides

Les glucides ou hydrates de carbone font partie des constituants les plus abondants et les plus vitaux de nombreux organismes (plantes, animaux et microorganismes). En rappel, les sucres sont issus de la photosynthèse qui est un processus endothermique de condensation de dioxyde de carbones grâce à l'énergie de la lumière. Ce processus se déroule entièrement chez les organismes possédant de la chlorophylle. Les animaux et plusieurs microorganismes dépendent donc des glucides produits par les plantes car constituent une source majeure d'énergie. En fonction de leur taille, les sucres sont classés en trois groupes : Les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides (Dewick, 2001).

1.1.1.1 Monosaccharides et leurs dérivés

Les monosaccharides sont des composés cristallins incolores, contenant une fonction aldéhyde (aldoses) ou cétone (cétoses) et plusieurs fonctions alcools. Les hexoses et les pentoses sont les formes les plus fréquemment rencontrées (Briemann et al., 2006). Des exemples de monosaccharides sont illustrés à la **figure 1.7**.

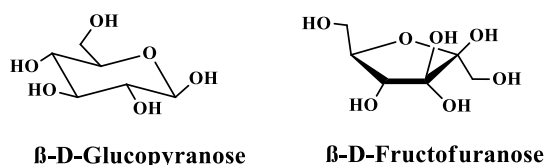


Figure 1.7 : Exemples de monosaccharides

Sous certaines conditions, les monosaccharides peuvent être transformés en acides aldoniques (oxydation de la fonction aldéhyde), acides uroniques (oxydation de la fonction alcool primaire des hexoses) et des acides aldariques (oxydation des fonctions aldéhyde et alcool terminaux). Aussi, la vitamine C est produite naturellement à partir de l'acide glucuronique. La réduction de la fonction aldéhyde des aldoses fournis des aldittols dont les exemples connus sont le glycérrol ou le sorbitol (Dewick, 2001).

1.1.1.2 Oligosaccharides et polysaccharides

Les sucres constitués de deux (2) à cinq (5) unités sont des oligosaccharides. Le maltose, le sucrose (ou saccharose) et le lactose (**figure 1.8**) sont des exemples d'oligosaccharides.

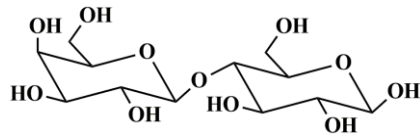


Figure 1.8: Structure du lactose

Les polysaccharides sont des molécules de haut poids moléculaire classés en fonction de leur solubilité dans l'eau. Les polysaccharides solubles dans l'eau sont généralement des réserves en énergie. Composé entièrement de résidus de glucose, l'amidon est la forme majeure de stockage de l'énergie dans les plantes. Chez les animaux, le sucre est stocké sous forme de glycogène.

Les polysaccharides insolubles dans l'eau assurent un rôle structural. En constituant majoritairement les parois cellulaires végétales, la cellulose est le matériau organique majoritaire terrestre. Elle se compose de chaînes étendues de glucose liée par des liaisons glycosidiques en $\beta 1 \rightarrow 4$. L'hémicellulose est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. Elle présente une composition hétérogène de diverses unités glucidiques en fonction du type de plante et du processus d'extraction. On retrouve des xyloanes, des mannanes, les arabinanes et des galactanes. Les pectines, l'agar, les gommes ou mucilages (gomme adragante, gomme arabique) et même l'héparine sont d'autres exemples de polysaccharides aux multiples applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Dewick, 2001).

1.1.1.4 Autres dérivés de glucides

De nombreux dérivés glucidiques, particulièrement ceux contenant de l'azote et issus pour la plupart du métabolisme de microorganismes sont dotés de nombreuses propriétés biologiques. Il s'agit par exemple des antibiotiques aminoglycosides ou de l'acarbose (**Figure 1.9**) inhibiteur de l'alpha glucosidase,

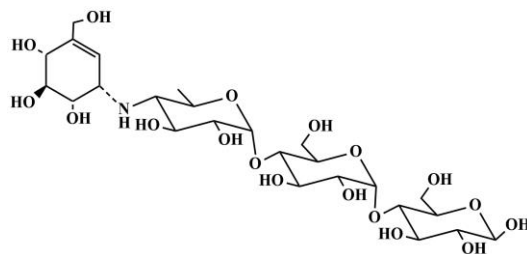


Figure 1.9 : Structure de l'acarbose.

1.1.2 Les poly-acétates

L'acide acétique, sous sa forme liée au coenzyme A (Acétyle CoA), occupe une place centrale dans la biosynthèse de nombreux composés naturels. Deux enzymes clés sont à l'origine de la condensation des unités acétates pour former des polyacétates. Il s'agit de la FAS (Fatty Acid Synthase) et le PKS (polyketides synthases). Ces enzymes produisent un poly- β -cétothioester qui subit des modifications secondaires (réduction, oxydation, cyclisation, condensation, méthylation) pour former une grande diversité de structure chimique (**Figure 1.10**) (Crozier et al., 2006; Dewick, 2001) .

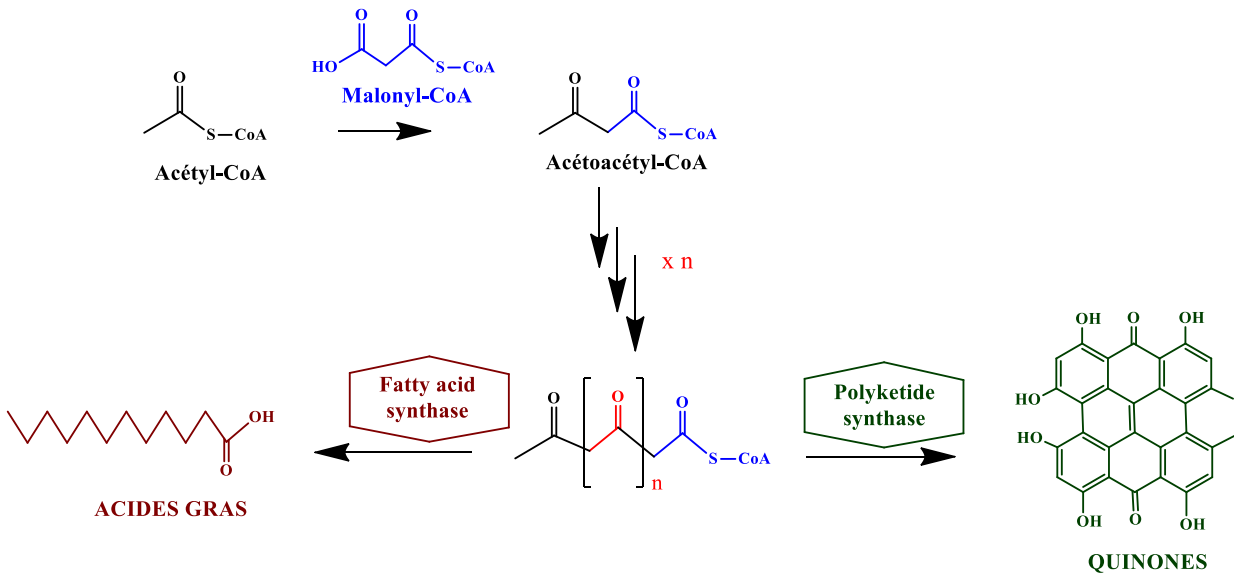


Figure 1.10: La voie de l'acide malonique (acétates)

1.1.2.1 Les métabolites de la FAS

La biosynthèse des lipides est assurée par la FAS (*Fatty Acid Synthase*). Elle assure des réactions d'addition et de condensation de malonyl-CoA provenant d'acetyl-CoA à travers des réactions de *Claisen*. Puis des processus de réduction et de déshydratation sont à l'origine de la diversité structurale observée dans les acides gras formés. Les lipides naturels portent entre quatre (4) et 30 atomes de carbones. Ils constituent des réserves énergétiques et participent essentiellement à la constitution des membranes biologiques en association avec les protéines (Dewick, 2001).

➤ Les acides gras et leurs dérivés

Les acides gras sont des lipides simples caractérisés par une partie polaire hydrophile (acide carboxylique) avec une longue chaîne hydrophobe. Ils entrent dans la constitution des huiles et des matières grasses.

Solides à température ambiante, les acides gras saturés entrent généralement dans la constitution des beurres et d'autres graisses animales. Les acides lauriques (12 :0), myristiques (14 :0), palmitiques (16 :0), stéariques (18 :0), arachidiques (20 :0) sont les acides gras saturés les plus courants. Une alimentation trop riche en acides gras saturés est associée à des risques de maladies cardiovasculaires.

Les acides gras peuvent porter une ou plusieurs doubles liaisons. L'acide oléique (18 :1) est l'acide gras mono-insaturé majoritaire de l'huile d'olive. Certains acides gras insaturés sont dits « indispensables » car ne sont pas synthétisés chez l'homme. C'est le cas des acides gras oméga 3 (ω -3) et oméga 6 (ω -6) impliqués dans la formation des membranes cellulaires, dans la production des eicosanoïdes et dans le développement et le fonctionnement du système nerveux. Il existe également des acides gras insaturés à triples liaisons. Ces acides

gras acétyléniques sont parfois à l'origine de l'extrême toxicité de certaines plantes comme la cigüe aquatique (*Cicuta virosa*).

Enfin, les acides gras se présentent très souvent sous la forme ester combinée au glycérol pour former les triglycérides. Des esters provenant de longues chaînes d'acides gras (C20 à C24) couplés avec des stérols ou de longues chaînes d'alcool forment les cires naturelles (Dewick, 2001).

➤ *Les eicosanoïdes*

Lipides rencontrés chez les animaux, les eicosanoïdes regroupent les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes et sont des dérivés d'acides gras en C₂₀ (acide eicosanoïque ou acide arachidique).

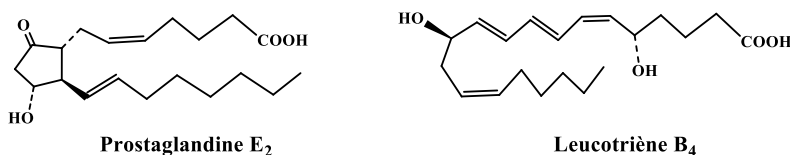


Figure 1.11: Exemple d'eicosanoïdes

Ces molécules biologiquement actives (**Figure 1.11**) à de très faibles concentrations régulent plusieurs processus physiologiques majeurs de l'organisme. Produites en trop fortes concentrations, elles participent à la réaction inflammatoire et, à ce titre, représentent des cibles pharmacologiques (Dewick, 2001).

1.1.2.2 Les métabolites des PKS

Les PKS catalysent la condensation des esters de coenzyme A. Les unités d'amorçage sont habituellement l'acétyl CoA ou le propionyl-CoA, tandis que le malonyl-CoA ou le méthylmalonyl-CoA sont les unités d'extension principale. A chaque cycle d'extension de la chaîne, les fonctions β-cétone peuvent être conservées ou modifiées en fonction de la présence d'un site catalytique de type kéderéductase (KR), déshydratase (DH) ou enoyl-réductase (ER) (Shen, 2003; Yu, Xu, Zeng et Zhan, 2012). Cette variabilité à chaque étape de la voie de la biosynthèse donne lieu à une diversité structurale beaucoup plus grande que celle des acides gras. Aussi, les PKS font l'objet de nombreuses manipulations génétiques dans le domaine de la biotechnologie. Ainsi, l'introduction de gènes codant pour des isoformes de PKS dans certains organismes à l'aide d'outils de génie génétique, permet la production de métabolites divers et plus actifs destinés à l'industrie pharmaceutique (Dewick, 2001).

➤ *Les poly-acétates aromatiques*

En fonction du nombre d'unités malonyles utilisées pour la condensation, une grande diversité de molécules issues de cette voie de biogénèse est connue.

L'assemblage d'unités malonyl-CoA est à l'origine de la diversité observée au sein de la famille chimique des quinones au sens large (**Figure 1.12**) (Dewick, 2001). Ces molécules présentent de nombreuses propriétés thérapeutiques: antibactériennes, antivirales, fongicides, cytotoxiques, laxatives (dihydroxy-

anthracéniques). Elles possèdent également un pouvoir allergisant non négligeable. Certaines quinones sont utilisées en cosmétiques et en teinturerie du fait de leur pouvoir colorant (Bruneton, 2009).

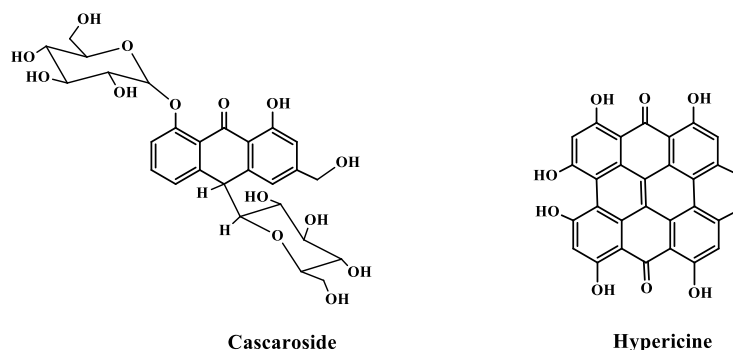


Figure 1.12: Exemples d'anthraquinones.

Le THC (Tétrahydrocannabinol), les tétracyclines antibiotiques et anticancéreuses sont également des polyacétates aromatiques utilisées en médecine (Dewick, 2001).

➤ Les poly-acétates non aromatiques

Les PKS sont également capables de produire des molécules non aromatiques dont les macrolides constituent un groupe important. Généralement constitués de 12, 14 ou 16 carbones, ces composés sont caractérisés par la présence d'un macrocycle comportant une fonction lactone. Issus de microorganismes du genre *streptomyces* pour la plupart, les macrolides sont dotés de propriétés antibactériennes, antifongiques (amphotéricine B, **figure 1.13**) et immunosuppressives (Dewick, 2001).

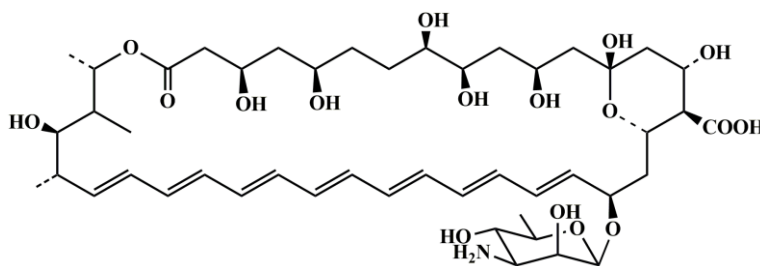


Figure 1.13: Structure de l'amphotéricine B. (Dewick, 2001)

1.1.3 Les composés phénoliques

Il s'agit d'un très vaste ensemble de composés non azotés, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique qui porte au moins un groupement hydroxyle, avec une origine biosynthétique précise: celle des acétates et/ou des shikimates. Cette définition exclut les alcaloïdes comme la morphine qui possède un azote, ou certains terpénoïdes comme le gossypol dont les fonctions phénoliques sont issues de réactions secondaires (**Figure 1.14**).

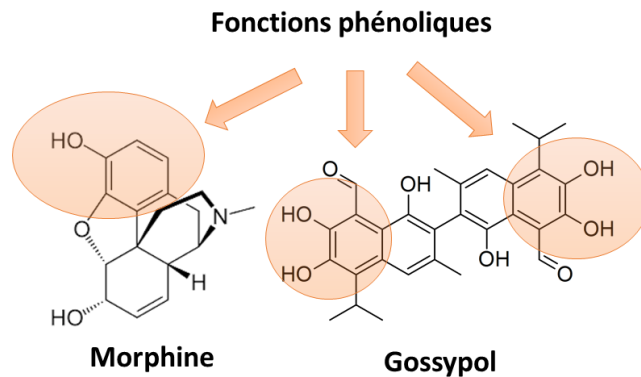


Figure 1.14: Exemple de composés non phénoliques

Plus de 8000 structures de polyphénols ont été décrites dans la littérature et sont largement dispersées dans le règne végétal. De nombreuses classifications sont proposées pour regrouper les composés phénoliques. Nous avons opté là également pour celles qui tiennent compte de l'origine biosynthétique, car elles permettent de comprendre la relation entre les différents groupes (Bruneton, 2009).

1.1.3.1 Les composés phénoliques issus strictement de la voie des shikimates

La voie des shikimates constitue une autre alternative pour la formation de composés aromatiques spécialement chez les microorganismes et les plantes. Cette voie de biosynthèse conduit également à la formation des acides aminés aromatiques (*phénylalanine*, *tyrosine* et *tryptophane*). Les étapes clés de la biosynthèse des composés issus de la voie des shikimates sont résumées dans la **figure 1.15**.

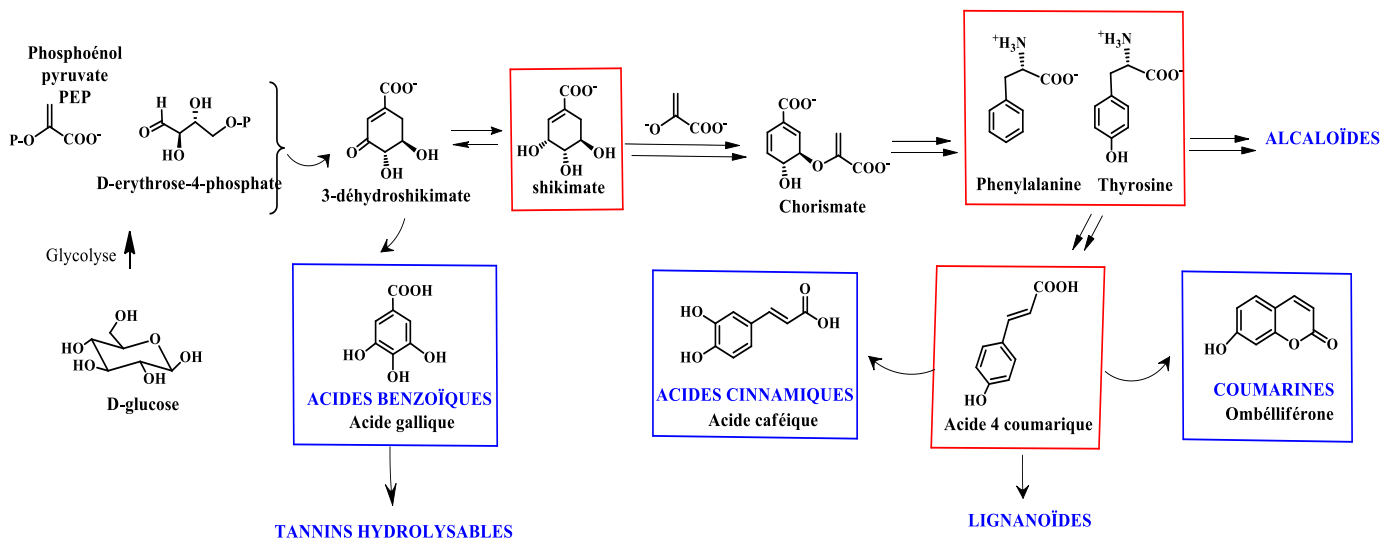


Figure 1.15: La voie des shikimates et sous-classes dérivées de composés phénoliques.

La condensation du *phospho-énol pyruvate* (PEP) avec l'*erythrose-4-phosphate*, tous issus de la glycolyse conduit aux shikimates et par des transformations ultérieures aux acides cinnamiques, aux phénylpropanoïdes et à la lignine (Bruneton, 2009).

➤ **Les acides phénols**

Les acides phénols peuvent dériver des acides benzoïques ou des acides cinnamiques.

Les acides phénols dérivés d'acides benzoïques sont en C_6C_1 et se retrouvent sous forme libre ou combinée à des sucres. L'acide gallique est un illustre représentant de ce groupe de composés phénolique. Ce dernier entre également dans la constitution des tanins hydrolysables (polyesters d'un sucre et un nombre variable d'acides phénols). La L-phénylalanine et la L-tyrosine sont les précurseurs de molécules souvent regroupées sous l'appellation phénylpropanoïdes dont les acides phénols dérivés d'acides cinnamiques font partie. De structure en C_6C_3 , ils sont le plus souvent, sous forme combinée (hétérosides).

Les acides phénols présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes: inhibiteurs enzymatiques (5-lipoxygénase, par exemple), propriétés antibactériennes et antifongiques. Ce sont également des antioxydants reconnus dans la prévention des maladies liées au stress oxydant (Bruneton, 2009).

➤ **Les coumarines**

L'hydroxylation des acides cinnamiques en ortho de la chaîne latérale, conduit à la formation d'un groupe de composés dérivés de lactone d'acide cinnamique qui sont les coumarines. Ce sont des composés en C_6C_3 comprenant un second cycle (benzo-2-pyrone) et, le plus souvent, hydroxylé en 7 (ombelliférone).

Les coumarines possèdent des propriétés veinotoniques et vasculoprotectrices. A cet effet, l'extrait de mélilot (*Melilotus officinalis*) est utilisé en thérapeutique pour le traitement symptomatique de l'insuffisance veino-lymphatique. (Bruneton, 2009).

➤ **Les lignanoïdes**

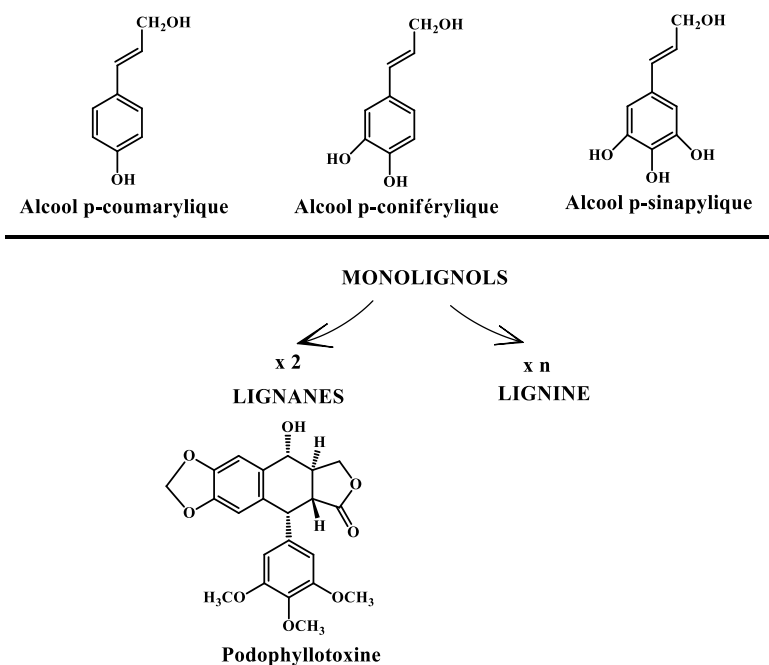


Figure 1.16: Les lignanoïdes.

Il s'agit d'un groupe de produit naturel constitué par la polymérisation d'unités en C_6C_3 dérivées des acides cinnamiques. Ces monolignols sont des alcools hydroxycinnamylique dont les plus importants sont l'alcool 4-hydroxycinnamylique (alcool p-coumaryl), l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (**Figure 1.16**). Les dimères de monolignols constituent la classe des lignanes (liaisons β - β) et des néolignanes (autres types de liaison). Des réactions secondaires de cyclisation peuvent conduire à une large gamme de lignanes structurels très différents. La podophyllotoxine est l'une des lignanes les plus célèbres connue pour ses activités cytotoxiques et anticancéreuses (Bruneton, 2009).

Les monolignols se polymérisent également pour donner la lignine, l'un des bio-polymères les plus abondants de la terre (après la cellulose). C'est une composante majeure du bois et caractéristique des plantes vasculaires. Alors que les gymnospermes polymérisent principalement l'alcool coniférylique, les dicotylédones utilisent l'alcool coniférique et l'alcool sinapylique et les monocotylédones utilisent les trois alcools (Bruneton, 2009).

1.1.3.2 Les composés phénoliques issus de la voie mixtes acétates / shikimates

Certaines classes de composées phénoliques proviennent de l'extension du motif phénylpropane (issus de la voie des shikimates) par l'addition successive d'unités malonyl-CoA (**Figure 1.17**) (Bruneton, 2009).

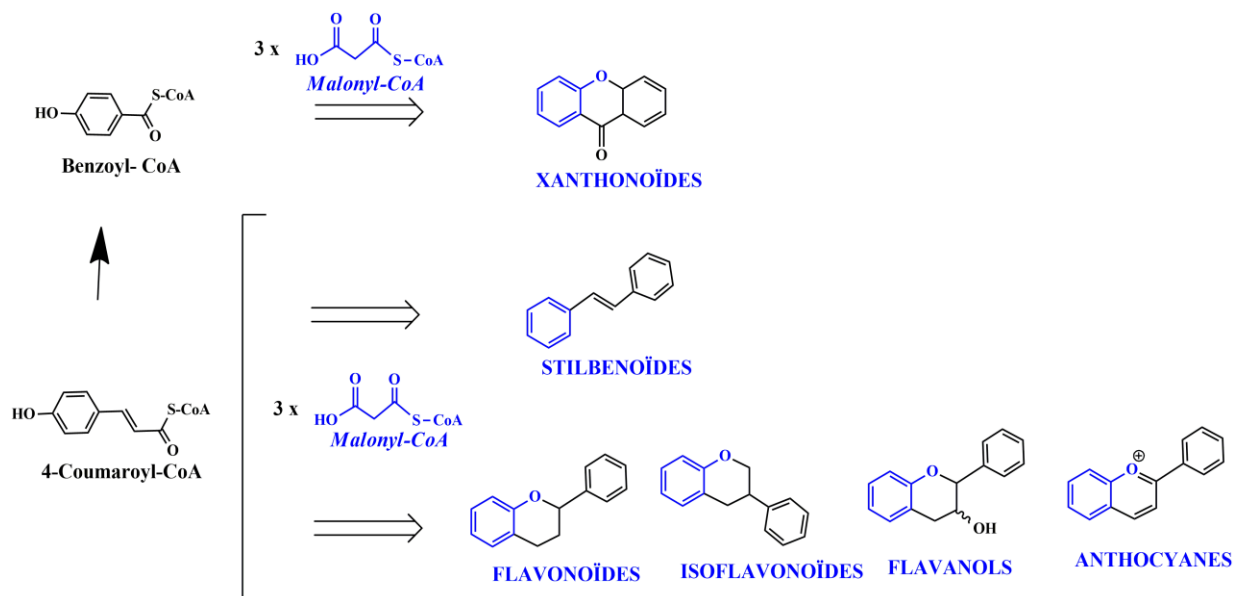


Figure 1.17: Les composés phénoliques issus des voies mixtes (acétates / shikimates).

➤ Les xanthonoïdes

Ces composés en $C_6C_1C_6$ peuvent se présenter sous forme d'aglycone, d'O-hétérosides ou de C-hétérosides et sont distribués de façon restreinte à certaines familles (clusiaceé notamment). Pigments naturels de couleur jaune, ces molécules possèdent également des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Bruneton, 2009).

➤ **Les stilbénoides**

Il s'agit de composés phénoliques possédant deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène ($C_6C_2C_6$). Généralement de configuration E (trans), ces composés peuvent se présenter sous forme libre ou hétérosidique. Au niveau thérapeutique, des stilbénoides ont montré des propriétés antitumorales (combretastatines), des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et préventives de maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (resvératrol) (Bruneton, 2009).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes au sens strict regroupent les anthoxantines (flavonols, flavones), leurs dérivés dihydrogénés (flavanones et dihydroflavonols) et les flavonoïdes « jaunes » (aurones et chalcones). Ces composés sont largement distribués dans le monde végétal (surtout dans les fruits et légumes) et peuvent se présenter sous forme hétéroside. Les flavonoïdes présentent de nombreuses propriétés biologiques : ils sont vasculoprotecteurs, veinotoniques, antioxydants, inhibiteurs enzymatiques (élastase, lipoxigénase, cyclooxygénase) et anti-inflammatoires (Bruneton, 2009).

➤ **Les dérivés flavaniques**

De structures très complexes, ils sont issus du métabolisme des flavonoïdes et se présentent sous forme de monomères (flavotannins qui est à la base d'astringents) ou d'oligomères et de polymères (tannins condensés ou proanthocyanidines). Ce sont de puissants antioxydants, anti-inflammatoires et des inhibiteurs enzymatiques. Les tanins condensés ont des propriétés thérapeutiques (antibactériennes, antifongiques) dues à leur capacité de complexation de macromolécules comme les protéines (astringence) (Crozier et al., 2006; Dewick, 2001)

➤ **Les anthocyanes**

Ces composés regroupent des pigments hydrosolubles de coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue et violette. De structure 2-phénylbenzopyrylium, ces pigments existent sous forme d'hétérosides. Les anthocyanes sont des composés veinotoniques et veinoprotecteurs, inhibiteurs d'enzymes protéolytiques (élastase et collagénase), anti-inflammatoires, antioxydants, colorants naturels (Bruneton, 2009).

➤ **Les isoflavonoïdes**

Ce sont des composés de structures 3-phénylchromanes rencontrés surtout chez les légumineuses. La conformation spatiale de ces molécules et leur polarité leur procurent des activités biologiques comparables à celle de l'œstradiol. C'est à dire que ces molécules sont estrogéniques. Les isoflavonoïdes comme la daidzéine sont donc des phyto-estrogènes que l'on retrouve notamment dans les produits de soja (Bruneton, 2009).

1.1.4 Les terpénoïdes et stéroïdes

1.1.4.1 Biosynthèse

Les terpénoïdes et stéroïdes représentent le plus vaste ensemble de métabolites secondaires connus chez

les plantes (près de 25.000 molécules). Ces composés sont élaborés à partir d'un précurseur spécifique de chaque classe de terpènes. Ce précurseur est obtenu à partir des additions séquentielles enzymo-catalysées d'un nombre variable d'unités isopréniques en C₅. Il s'agit de l'isopentényl diphosphate (IPP) formé à partir d'un « starter » qui est le diméthylallyle diphosphate (DMAPP) (Bruneton, 2009).

Deux voies de biosynthèse des unités isopréniques ont été mises en évidence dans les plantes (**Figure 1.18**). La première voie utilise de l'acide mévalonique (MEV) et a lieu dans le cytoplasme des cellules (indépendamment des organes). Elle conduit *in fine* à la formation de farnésylpyrophosphate (FPP) et le squalène, respectivement à l'origine de terpénoïdes en C₁₅ et C₃₀ (voir C₂₇ pour les stéroïdes). La seconde voie de biosynthèse utilise du méthylerythritol4-phosphate (MEP) et est localisée spécifiquement au niveau des chloroplastes (donc principalement dans les feuilles) pour fournir des précurseurs géranylpyrophosphate (GPP), géranylgéranylpyrophosphate (GGPP) et phytoène. Ils fournissent donc respectivement des terpénoïdes en C₁₀, C₂₀ et C₄₀. Ces précurseurs de la condensation d'unités isopréniques (C₅)_n subissent des réactions secondaires de cyclisation, de fonctionnalisation et de réarrangement à l'origine de la diversité structurale observée dans cette famille de produits naturels (Crozier et al., 2006).

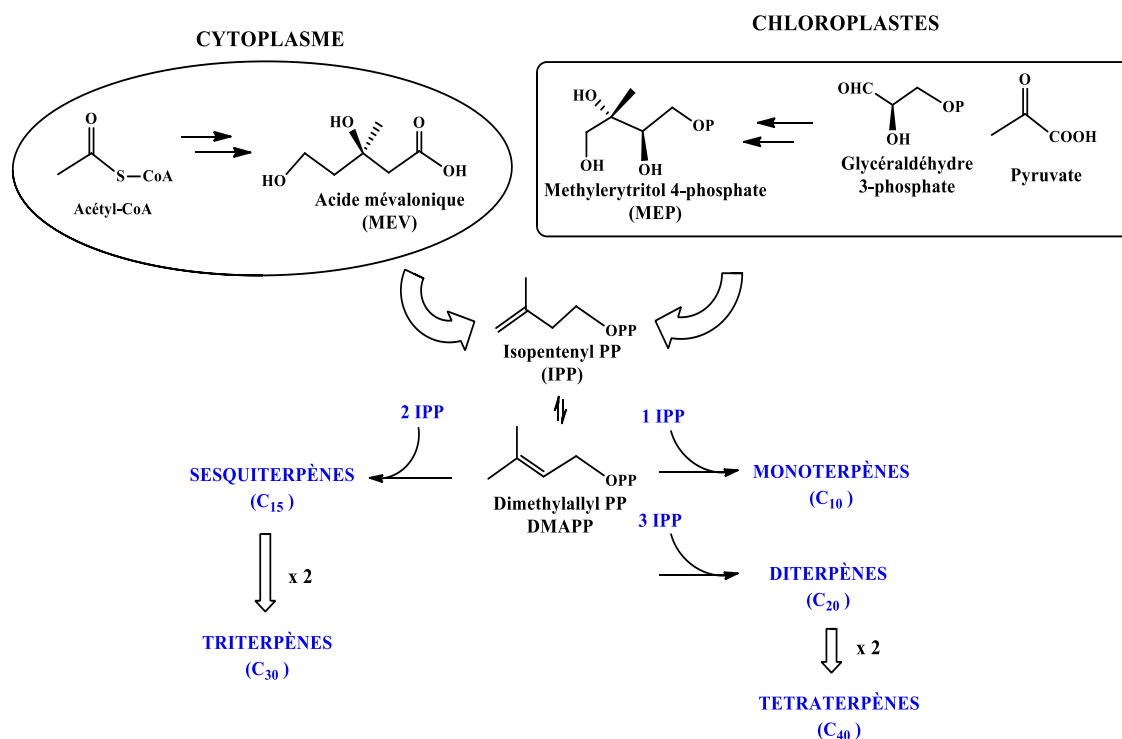


Figure 1.18: Voie de biosynthèse de terpénoïdes.

1.1.4.2 Différentes classes

➤ Les monoterpènes

Les monoterpènes sont issus du couplage de 2 hémiterpènes (DMAPP et IPP). Les monoterpènes réguliers (menthol), les monoterpènes irréguliers (acide pyrethrique) et les irridoides (loganine) constituent

l'ensemble de cette classe de terpènes (**Figure 1.19**) (Bruneton, 2009).

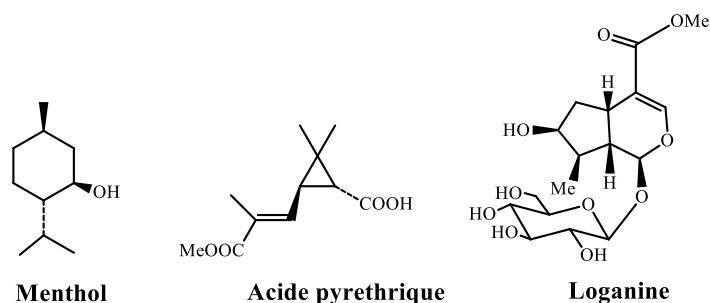


Figure 1.19: Exemples de monoterpènes.

➤ Les sesquiterpènes

Ces composés ont pour précurseur le farnésylpyrophosphate. La grande réactivité de ce dernier et les multiples réactions secondaires qu'il peut subir conduit à une très forte diversité structurale. Un grand nombre de sesquiterpènes entrent également dans la composition des huiles essentielles. Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe de molécules pharmacologiquement actives. L'artémisinine (*Artemisia annua*, Asteraceae) en est un exemple (**figure 1.20**) (Dewick, 2001).

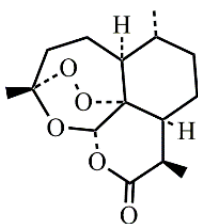


Figure 1.20 : Structure de l'artémisinine.

➤ Les diterpènes

Ils sont formés à partir du géranylgeranylpyrophosphate. Ces composés présentent une diversité structurale remarquable (di-, tri- et même parfois tétracycliques). Même si certains diterpènes possèdent des propriétés antihypertensives et antitumorales, l'intérêt thérapeutique de ces composés reste encore limité. Le paclitaxel (*Taxus brevifolia*, Taxaceae) est l'un des rares diterpènes utilisé en thérapeutique comme important agent anticancéreux **Figure 1.21** (Dewick, 2001).

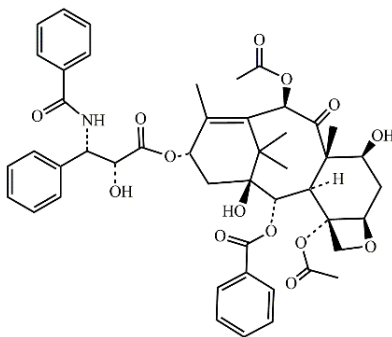


Figure 1.21: Structure du paclitaxel.

➤ Les triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont des composés provenant du squalène (deux molécules de farnesyl PP couplées « queue à queue »). Le lanosterol (**Figure 1.22**) est typiquement le triterpène précurseurs des stéroïdes respectivement chez les animaux et les plantes par des réactions de déméthylation progressive en C4 et C14 (Dewick, 2001).

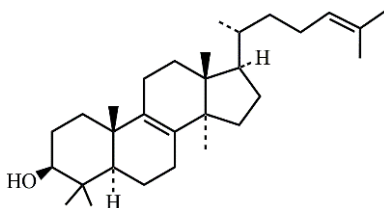


Figure 1.22: Structure du lanostérol.

Les stéroïdes sont des structures tétracycliques dont les variations de la chaîne latérale sont à l'origine d'une diversité étonnante. Le cholestérol est le principal stéroïde rencontré chez les animaux du fait de sa présence dans les membranes cellulaires de tous les tissus. Il agit également comme un précurseur dans la formation des corticostéroïdes, des acides biliaires, de la vitamine D et des hormones sexuelles chez les mammifères. Les plantes ont quant à elles le campestérol (**Figure 1.23**) comme stéroïde majoritaire (Dewick, 2001).

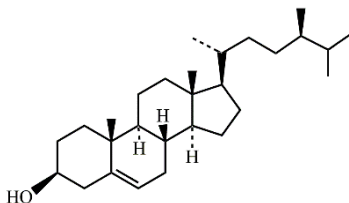


Figure 1.23: Structure du campestérol.

➤ Les saponosides

Ce sont des hétérosides de triterpènes ou de stéroïdes caractérisés par leurs propriétés tensio-actives. Les saponosides provoquent une hémolyse des globules rouges en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, d'où leur toxicité lorsqu'ils sont injectés dans la circulation sanguine. Cependant, ils sont relativement inoffensifs lorsqu'ils sont pris par voie orale. Les saponosides ont également des propriétés antifongiques et antivirales, anti-inflammatoires, antitussives et expectorantes (Bruneton, 2009).

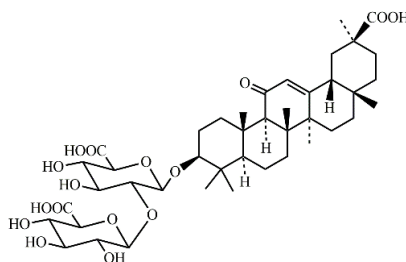


Figure 1.24: Structure de l'acide glycyrrhizique.

Les saponosides triterpéniques sont abondantes dans de nombreuses familles de dicotylédones alors que ceux issus de stéroïdes sont plutôt confinés aux monocotylédones. La racine de réglisse médicinale (*Glycyrrhiza glabra*; Fabacées) contient de l'acide glycyrrhizique (**Figure 1.24**) qui serait à l'origine de ses propriétés antiulcéreuses (Dewick, 2001).

➤ *Les hétérosides cardiotoniques*

Ce sont des molécules utilisées dans le traitement au long cours des insuffisances cardiaques bien que les dosages thérapeutiques soient très proches de celles toxiques. La digoxine (**Figure 1.25**) extraite de *Digitalis lanata* (Scrophulariacées) est le glycoside cardio-actif le plus utilisé en thérapeutique. De nombreuses plantes ornementales contiennent des glycosides cardio-actifs et devraient être manipulées avec prudence compte tenu de leur toxicité (Dewick, 2001).

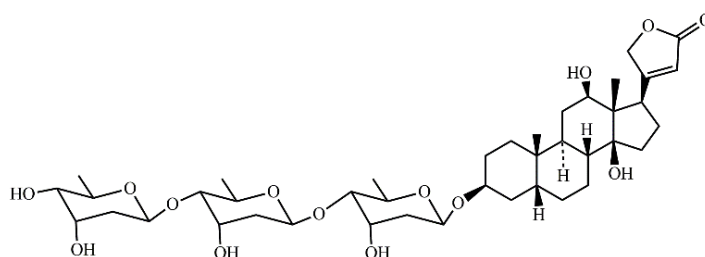


Figure 25: Structure de la digoxine

➤ *Caroténoïdes*

Issus de la condensation de 2 géranylgeranylpyrophosphates en « queue à queue », les caroténoïdes sont des pigments apolaires de couleur jaune, orange ou rouge. Ces composés jouent un rôle dans la photosynthèse, mais sont également présents dans des tissus non photosynthétiques comme dans les champignons et les bactéries. La couleur orange des carottes (*Daucus carota*, Umbelliferae / Apiaceae) est causée par le β -carotène. (**Figure 1.26**)

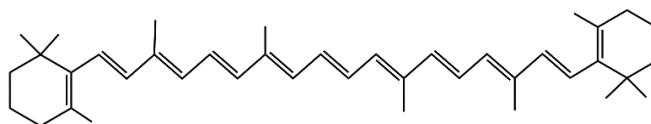


Figure 1.26: Structure du β -carotène

➤ *Les terpénoïdes quinones*

Ce groupe de composés n'appartient pas proprement dit aux terpénoïdes mais fait intervenir cette voie de biosynthèse avec celle permettant d'obtenir des composés aromatiques (voie des polyacétates et celle des shikimates).

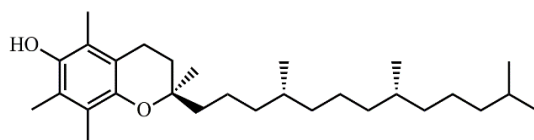


Figure 1.27: Structure du tocophérol α

Produits à partir de l'acide homogentisique, les tocophérols (tocophérol α , **figure 1.27**) constituent le groupe des vitamines E liposolubles que l'on retrouve fréquemment dans les chloroplastes. Les tocophérols réputés pour leur activité antioxydante sont largement distribués dans les plantes, avec des niveaux élevés dans les graines de céréales telles que le blé, l'orge et le seigle (Dewick, 2001).

1.1.5 Les acides aminés et les composés issus de leur métabolisme

Outre l'acétyl-CoA, l'acide shikimique et les unités isopréniques, d'autres blocs de construction à base d'acides aminés sont utilisés dans la synthèse des produits naturels. Caractérisés par la présence d'azote, les peptides, les protéines et les alcaloïdes sont les principales classes de produits naturels dérivés d'acides aminés.

1.1.5.1 Les acides aminés

En fonction des organismes, les acides aminés proviennent: (Bhagavan, 2002)

- du recyclage des protéines déjà présentes pour permettre leur renouvellement,
- de l'incorporation initiale de l'azote par transamination sur les intermédiaires issus de la glycolyse ou du cycle Krebs (cycle de l'acide tricarboxylique, TCA),
- de la voie du shikimate en ce qui concerne les acides aminés aromatiques,
- de l'apport alimentaire

Les acides aminés peuvent être classés en fonction de leur participation à la formation des protéines. Dans le cas échéant, ce sont les acides aminés protéinogènes. Les plantes et certaines bactéries synthétisent presque tous les acides aminés protéinogènes. Les humains (et d'autres animaux) n'en synthétisent qu'une partie, le reste devant être apporté par l'alimentation. A la différence des acides gras et du glucose, les acides aminés excédentaires au métabolisme ne peuvent être stockés ni excrétés. Ils sont donc éliminés via le cycle de l'urée ou recyclés dans le métabolisme des acides gras et des sucres (Berg, Tymoczko, et Stryer 2002).

Hormis la vingtaine d'acides aminés protéinogènes, les restes des acides aminés naturels (environ 300 chez les plantes, donc la majorité) sont non protéiques, et très souvent des anti-métabolites. C'est-à-dire que, du fait de leur isostérie avec les acides aminés normaux, ils peuvent interférer lors de la biosynthèse des acides aminés donnant lieu très souvent à des protéines non fonctionnelles. Ils peuvent, ainsi donc, s'avérer toxiques pour les microorganismes (bactéries et champignons), les animaux (prédateurs, insectes) mais aussi pour l'homme. Des exemples d'acides aminés non protéiques sont présentés dans la **figure 1.28**.

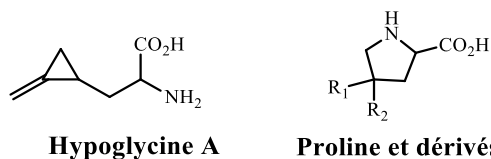


Figure 1.28: Exemples d'acides aminés non protéiques.

1.1.5.2 Les peptides et les protéines

Les peptides et les protéines sont des polyamides provenant de la polymérisation d'acides aminés liés les uns aux autres par leurs fonctions carboxyle et α -amino. Cette liaison amide est traditionnellement appelée liaison peptidique. Généralement, lorsque la longueur de chaîne dépasse les 40 résidus, on lui confère le statut protéique. Les peptides et les protéines présentent une grande variété de fonctions biologiques en fonction de leur origine.

Les protéines ribosomales sont des polypeptides dont la synthèse fait intervenir des ARN (Acides Ribonucléiques) transcrits à partir de l'ADN (Acides désoxyribo-Nucléiques) des individus. Il s'agit donc de molécules synthétisées sous contrôle génétique. Ils subissent ensuite des modifications post-traductionnelles pour donner d'importantes glycoprotéines, lipoprotéines et des phosphoprotéines. Les polypeptides ribosomaux assurent des fonctions biologiques incommensurables dans la constitution des êtres vivants (protéines membranaires et du cytosquelette), dans des fonctions de communication (hormones thyroïdiennes, hypophysaires, pancréatiques, peptides opioïdes, cytokines, ...) et de régulation du métabolisme (enzymes).

A la différence des peptides et des protéines ribosomales dont la synthèse est régie par le code génétique, de nombreux polypeptides naturels sont synthétisés lors d'un processus séquentiel dans lequel chaque acide aminé est rajouté de façon spécifique par une enzyme. Avec un agencement modulaire comparable à celui des PKS, les *non-ribosomal peptide synthase* (NRPS) sont les enzymes multifonctionnelles responsables de la formation de ce type de produits naturels que l'on croise spécialement chez les microorganismes (Dewick, 2001).

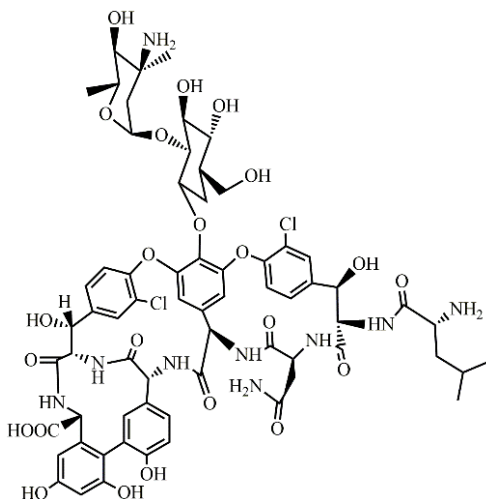


Figure 1.29: Structure de la vancomycine.

De nombreux peptides microbiens sont issus de cette voie de synthèse qui utilise beaucoup d'acides aminés non protéinogènes. Ces peptides présentent pour la plupart des propriétés pharmacologiques intéressantes utilisées en médecine, notamment comme antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, vancomycine) (**Figure 1.29**) ou immunosuppresseurs (cyclosporines). Aussi, des toxines de nature peptidique comme la toxine botulinique (de *Clostridium botulinum*), les phallotoxines et les amatoxines d'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*), et certains venins de serpent sont issus de cette voie de biosynthèse.

Enfin, comme pour les PKS, le génie génétique sur les NRPS permet la production d'une grande diversité de dérivés peptidiques ayant des propriétés biologiques intéressantes.

1.1.5.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des bases azotées organiques d'origine naturelle qui constituent le plus grand groupe de métabolites secondaires contenant de l'azote (plus de 12 000 alcaloïdes sont connus à ce jour); ils sont répartis en plus d'une vingtaine de familles. Ils sont caractérisés par leur distribution restreinte et leur propriété pharmacologique significative à très faibles doses, souvent due à la protonation de la fonction amine dans les pH physiologiques. Ce sont des analgésiques (morphine, codéine), des relaxants musculaires (tubocurarine), des antibiotiques (berbérine et sanguinarine), des agents anticancéreux (vinblastine), des anti-arythmiques (ajmaline), des sédatifs (scopolamine) etc... (Bruneton, 2009). La structure de la morphine est présentée comme exemple dans la **figure 1.30** ci-dessous.

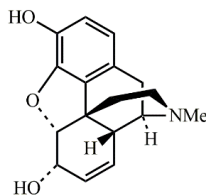


Figure 1.30: Structure de la morphine.

Les atomes d'azote des vrais alcaloïdes proviennent d'un acide aminé et en générale ils sont classés en fonction des acides aminés dont ils dérivent. Les unités de construction provenant de la voie des acétates, des shikimates ou du MEP participent également à la construction des alcaloïdes. En outre, ces unités issues d'autres voies de biosynthèse subissent parfois des réactions de transamination pour donner le grand groupe des pseudo-alcaloïdes (Dewick, 2001).

1.1.5.4 Hétérosides cyanogènes

Sous certaines conditions, les organismes ont la capacité de produire de l'acide cyanhydrique. Ces composés regroupés sous l'appellation de glycosides cyanogènes dérivent d'acides aminés (phénylalanine, la tyrosine, la valine, l'isoleucine, la leucine). Lorsque ces plantes subissent des agressions physiques, des enzymes cytoplasmiques induisent l'hydrolyse de ces composés qui libèrent de l'acide cyanhydrique, un véritable poison qui provoque des intoxications sévères chez les animaux et les hommes. L'amygdaline (**Figure 1.31**) est un

exemple de glycoside cyanogène que l'on retrouve dans les noyaux d'abricots, de pêches, de cerises et de prunes (Bruneton, 2009).

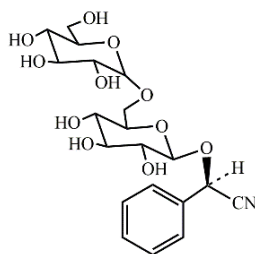


Figure 1.31: Structure de l'amygdaline.

1.1.5.5 Les hétérosides soufrés ou glucosinolates

Ce sont des hétérosides anioniques responsables des fortes odeurs et de la saveur amère ou piquante des espèces de la famille des brassicacées (moutarde, chou, brocolis etc.). Comme les hétérosides cyanogènes, ces substances naturelles dérivent des acides aminés (phénylalanines, tyrosine, tryptophane, homométhionine et homophénylalanine). Lorsque les tissus de ces plantes sont lésés, les glucosilates contenus sont hydrolysés par la myrosinase (thioglucosidase) pour donner naissance à de l'isothiocyanate volatile (forte odeur). La sinalbine (**Figure 1.32**) des graines de moutarde blanche (*Sinapis alba*, Brassicacées) est un exemple de glucosinolates (Bruneton, 2009).

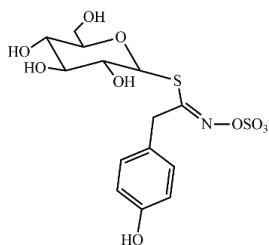


Figure 1.32: Structure de la sinalbine.

1.1.5.7 Les bétalaïnes

Les bétaxanthines (jaune) et bétacyanines (rouge et violet) sont des pigments végétaux caractéristiques de champignons et de plantes de l'ordre des Caryophyllales où ils remplacent les anthocyanes. Ces composés n'ont pas d'intérêt thérapeutique, mais sont très prisés par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés antioxydantes et colorantes. La bétanine est un exemple de bétalaïnes présent dans la betterave (**Figure 1.33**) (Bruneton, 2009).

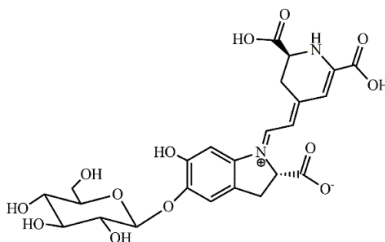


Figure 1.33: Structure de la bétanine.

1.1.5.6 Les tétrapyrroles

Sous forme de cycle de quatre sous-unités de pyrrole liées par des ponts méthine, le degré de saturation ou l'état d'oxydation est à la base de la classification des tétrapyrroles qui sont des macrocycles issus de la glycine (Senge et al. 2014; Wu et al. 2017) .

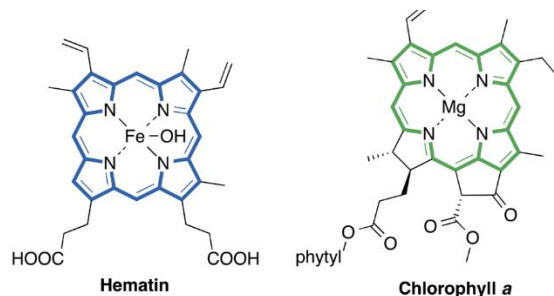


Figure 1.34: Exemples de tétrapyrroles.

Connu sous le nom de « pigment de la vie », l'hème et la chlorophylle (**Figure 1.34**) sont les tétrapyrroles les plus connus. Ces pigments sont responsables de la couleur rouge du sang et de la couleur verte des feuilles. Ces macromolécules ubiquitaires participent à de nombreux processus biochimiques cruciaux dont la respiration, la photosynthèse et le métabolisme cellulaire comme cofacteurs d'enzymes catalytique (C. Y. Chen, Taniguchi et Lindsey, 2014).

1.2 Méthodes d'obtention d'extractibles

L'extraction est la première étape de l'étude des substances naturelles. Malgré la performance des techniques d'analyses, cette étape demeure d'une importance majeure et cruciale. Il n'existe pas de méthode d'extraction standard pour l'obtention de produits naturels. La méthode choisie doit prendre en compte la nature de la matrice que l'on étudie et celle des molécules ciblées. Quelle que soit la méthode choisie, le rendement en extrait et la sélectivité demeurent des critères d'évaluation du processus d'extraction (Azmir et al., 2013).

1.2.1 Les méthodes d'extraction classiques

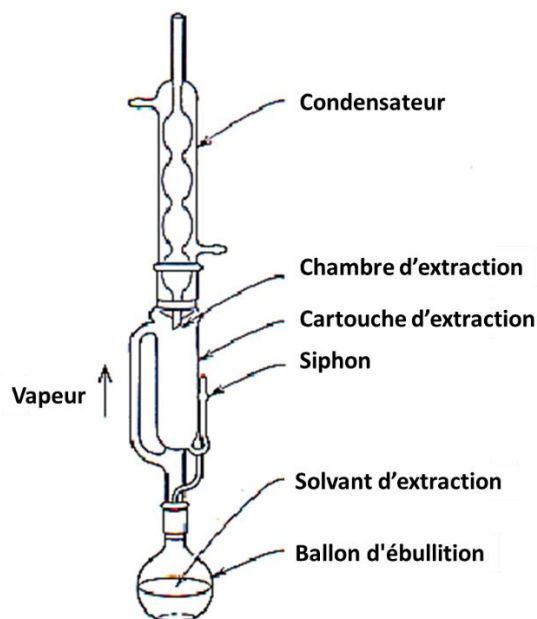
Il s'agit des méthodes utilisées traditionnellement pour obtenir des produits naturels

1.2.1.1 La macération

C'est la technique classique d'extraction qui consiste à mettre en contact la matière végétale avec le solvant d'extraction. Cette technique est basée sur le pouvoir de solvatation des solvants avec l'application de chaleur ou de système d'agitation en continu. L'efficacité d'un tel procédé dépend donc principalement du choix des solvants. La polarité des composés ciblés est le facteur le plus important pour le choix du solvant, mais l'utilisation de co-solvant, la sécurité d'emploi, la toxicité et la faisabilité financière doivent également être prises en compte. L'application de chaleur et l'agitation accélèrent généralement la cinétique d'extraction en diffusant plus aisément le soluté à travers l'interface entre la matrice solide et le solvant (Azmir et al., 2013).

1.2.1.2 Extraction au Soxhlet

Le Soxhlet est la méthode de référence des méthodes classiques d'extraction. Elle est souvent utilisée pour évaluer l'efficacité de nouvelles techniques d'extractions.



Adapté de Sitholé, Shirin, et Ambayec (2010) avec permissions de l'éditeur
Figure 1.35: Principe de l'extraction au soxhlet.

La matière à extraire est placée dans une cartouche de filtre qui est progressivement remplie par du solvant frais condensé directement à la partie supérieure. L'extrait est directement filtré et entraîné vers un système de siphonage qui permet son retour dans le ballon chauffé. Le processus est répété jusqu'à ce que les composés soient concentrés dans le ballon (**Figure 1.35**) (Azmir et al., 2013). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle n'est pas adaptée aux composés thermosensibles.

1.2.2 Les méthodes d'extraction non conventionnelles

Le temps d'extraction, le coût élevé de l'utilisation de grand volume de solvant de haute pureté, l'évaporation de grandes quantités de solvants et les risques liés à la détérioration des composés thermolabiles représentent les principaux inconvénients majeurs des méthodes d'extraction classique. Afin de pallier ces limites, de nouvelles et prometteuses techniques d'extraction ont été développées.

Les méthodes d'extraction non conventionnelles sont plus respectueuses de l'environnement, car elles tendent à réduire le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisée tout en fournissant un meilleur rendement et une meilleure qualité de l'extrait obtenu. Certaines de ces techniques ont le label "techniques vertes" car elles sont conformes aux normes établies par l'agence américaine de protection environnementale (Azmir et al., 2013).

1.2.2.1 Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons, habituellement utilisés entre 20 kHz à 100 MHz traversent la matière en créant des phénomènes de compression et d'expansion à l'origine de la production de cavitations. L'énergie des ultrasons facilite la lixiviation des composés hors de la matrice végétale, intensifiant ainsi le transfert de masse et accélérant leur accès par les solvants d'extraction (Vardanega, Santos et Meireles, 2014). Les principaux facteurs influençant l'efficacité des extractions sont : la teneur en humidité de l'échantillon, la taille des particules, le solvant, la température, la fréquence et le temps de sonication (Azmir et al., 2013).

1.2.2.2 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes utilise l'énergie des micro-ondes qui sont des champs électromagnétiques dans la gamme de fréquences de 300 MHz à 300 GHz. Le principe du chauffage, en utilisant les micro-ondes, est basé sur les matières polaires. La chaleur est générée par la conduction ionique et le phénomène de rotation des dipôles (collision entre les molécules) (Destandau, Michel et Elfakir, 2013). Le mécanisme d'extraction assistée par micro-ondes implique trois étapes : (1) la libération des métabolites par la matrice induite par l'augmentation de la température et de la pression dans la matrice ; (2) la diffusion du solvant à travers la matrice et (3) le transfert des solutés au solvant (Azmir et al., 2013).

1.2.2.3 Extraction assistée par un champ électrique pulsé

Le principe du traitement par un champ électrique pulsé (0.5 –1.5 V) est de détruire la structure de la membrane cellulaire afin de récupérer le contenu cellulaire. En effet, l'application d'un champ électrique à travers les cellules de la matière végétale entraîne une accumulation de charges à la surface des membranes. Ceci occasionne donc dans le milieu cellulaire une séparation des molécules en fonction de leur charge (les molécules chargées positivement migrent vers le pôle négatif et réciproquement). L'accumulation des charges de signes opposés, provoque une compression de la membrane qui s'amincit. Passé un certain seuil critique du potentiel électrique, des ruptures localisées se créent formant ainsi des pores dans la membrane (électroporation) (Hewapathirane et Haas, 2008). L'augmentation drastique de la perméabilité cellulaire est à l'origine de l'efficacité de ces extractions, même à basses températures (Azmir et al., 2013).

1.2.2.4 Extraction assistée par enzyme

Dans les matrices végétales, certains composés sont dispersés dans le cytoplasme des cellules. Cependant, d'autres se retrouvent encastrés dans des réseaux de polysaccharide-lignine par des liaisons hydrogènes ou hydrophobes, les rendant ainsi inaccessibles avec les solvants lors de procédés classiques d'extraction.

Le prétraitement enzymatique est donc un moyen novateur et efficace de libérer des composés pour augmenter le rendement global en extraction. Ainsi, l'ajout d'enzymes spécifiques telles que des cellulases, des amylases ou des pectinases pendant l'extraction améliore le rendement en extraction par rupture de la paroi cellulaire et l'hydrolyse des polysaccharides structurels (Azmir et al., 2013).

1.2.2.5 Extraction liquide pressurisée ou accélérée

La méthode d'extraction implique l'utilisation d'une pression élevée afin de garder le solvant d'extraction à l'état liquide pour des températures supérieures à son point d'ébullition à pression normale.

Cette méthode s'est beaucoup illustrée avec l'eau comme solvant d'extraction à travers l'extraction par eau chaude pressurisée ou sous-critique. À température ambiante et à pression atmosphérique, l'eau présente une constante diélectrique (ϵ) très élevée. L'augmentation de sa température entraîne une augmentation de sa capacité de diffusion qui s'accompagne d'une diminution de ses constantes de tension de surface, de permittivité et de viscosité. Avec une pression suffisante pour la maintenir liquide à une température élevée, la constante diélectrique de l'eau qui est de $\epsilon = 80$ à 25 °C, passe à $\epsilon = 27$ à 250 °C sous 50 bar (à 25 °C la constante diélectrique ϵ du méthanol = 33 et ϵ éthanol = 24). Dans ces conditions, l'eau se comporte comme certains solvants organiques qui peuvent dissoudre des molécules peu polaires.

La forte température d'extraction favorise une meilleure solubilité des molécules, et une augmentation du transfert de masse. Cependant, cette technique est inadaptée aux molécules thermosensibles. La pression force le solvant dans toutes les zones de la matrice facilitant ainsi l'extraction des molécules piégées dans les pores (Azmir et al., 2013).

1.2.2.6 Extraction par fluides supercritiques

La technique d'extraction par fluide supercritique a suscité un grand intérêt, surtout dans la production de café décaféiné. Un fluide supercritique est obtenu en soumettant un corps à des températures et des pressions au-delà du point critique où les propriétés de sa phase gazeuse et liquide convergent. Les fluides supercritiques possèdent donc les propriétés de diffusion, de viscosité et de tension de surface des gaz et la densité et la puissance de solvation des liquides. Ces propriétés les rendent performantes pour l'extraction de composés naturels de haute qualité.

Le dioxyde de carbone (CO_2) est très souvent utilisé pour l'extraction en phase supercritique des composés apolaires. Cependant, des solvants, comme le méthanol et l'eau, sont souvent incorporés à faibles pourcentages pour extraire des composés plus polaires.

Il a été rapporté que la taille des particules, la porosité, et la teneur en eau de la matière végétale influençaient les rendements et la qualité de l'extraction par fluide supercritique. Le coût de l'appareillage reste un facteur majeur limitant la vulgarisation de cette technique (Azmir et al., 2013).

1.3 Méthodes d'analyse des extractibles

1.3.1 Les méthodes de détection et de quantification colorimétriques

1.3.1.1 Généralité

Il s'agit de loin, la première approche pour l'exploration de produits naturels. Les premières techniques colorimétriques consistaient surtout en une comparaison visuelle entre la couleur d'un échantillon et celle de références pouvant être la même substance (ou de la même famille chimique) à des concentrations connues.

Aujourd'hui, les spectrophotomètres mesurent efficacement la quantité de lumière colorée absorbée par un échantillon coloré par rapport à un échantillon "blanc" ou incolore (Sampietro, Sgariglia, Soberón, Quiroga et Vattuone, 2009).

Basé sur des mesures d'absorbance de complexes colorés dont les maxima d'absorption se situent dans le domaine de la lumière visible, la colorimétrie permet l'évaluation qualitative et quantitative de composés présents dans un échantillon. Ces complexes colorés résultent le plus souvent de la réactivité plus ou moins spécifique d'agents chimiques particuliers avec certaines familles de composés naturels. Ainsi, il est possible de connaître la nature chimique des composés présents dans un extrait naturel en les mettant en évidence et même en les quantifiant selon la loi de Beer-Lambert: (Sampietro et al., 2009)

$$A = -\log(T) = -\log\frac{I'}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot C$$

Où A est l'absorbance, T la transmittance, I et I' les intensités de la lumière incidente et sortante respectivement, $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ (en L/mol /cm), l l'épaisseur de la cuve (en cm) et C la concentration de l'échantillon (en mol/L).

1.3.1.2 Les méthodes usuelles dans l'exploration des produits naturels

Une multitude de réactifs chimiques permet l'exploration de la nature chimique des produits naturels. Certains de ces réactifs sont plutôt employés dans l'optique d'une mise en évidence alors que d'autres permettent leur quantification. Dans le cadre d'une simple détection, ces réactifs sont très souvent utilisés comme révélateurs à la suite d'une chromatographie sur couche mince.

➤ *Les révélateurs de familles chimiques*

Ces réactifs sont directement mis en contact avec l'extrait à étudier ou appliqués sur une plaque de CCM après la séparation de ses constituants (voir méthode de séparation).

Les révélateurs non spécifiques

Ces réactifs universels sont utilisés pour la détection d'une grande variété de produits naturels dont les terpénoïdes, des stéroïdes, des saponosides, les sucres et les phénols, qui apparaissent de différentes couleurs (Hostettmann et Marston, 2005).

La réactivité de ces aldéhydes aromatiques (p-anisaldéhyde, vanilline) couramment utilisés serait liée à la sensibilité de leur fonction carbonyle, qui activée en milieu fortement acide peut condenser avec des molécules nucléophiles (réactivité de plusieurs fonctions chimiques) (Stahl et Glatz, 1982).

Les mécanismes réactionnels n'ont pas été élucidés pour toutes ces familles chimiques. Cependant, dans le cas des triterpènes / stéroïdes, la formation d'un intermédiaire cation pentacyclényle à partir de l'hydroxyle en 3 (3-OH), qui se condense ensuite avec ces réactifs activés en milieu acide serait à l'origine de la formation des composés colorés. Lors d'une exploration par CCM (Chromatographie sur Couche Mince), les différentes couleurs observées suite au chauffage seraient dues à la présence de groupements fonctionnels (insaturations

conjugués, éthers cycliques etc...) qui apportent souvent des informations supplémentaires sur la structure initiale des composés (Hiai, Oura et Nakajima, 1976).

Les révélateurs de fonctions phénoliques

Le réactif de Neu : Il se compose de 2-Aminoethyl diphenylborinate et de polyéthylène glycol (PEG) et permet de révéler surtout la présence de flavonoïdes mais aussi des acides phénols après une CCM. Les groupements hydroxyles de ces composés sont capables de réagir avec le 2-Aminoethyl diphenylborinate pour donner des composés fluorescents stabilisés par le PEG. Après excitation par des rayonnements UV à 366 nm, la fluorescence des différents spots renseigne sur la nature de ces polyphénols : flavonols (jaune-orange), flavones (jaune-vert), acides phénols (bleue-blanche) (Brasseur et Angenot, 1986).

Réactif de Bornsträger : Ce réactif est très utilisé comme révélateur de CCM. Il s'agit d'une réaction d'oxydation (déshydratation) en milieu aqueux alcalin (KOH) qui conduit à la formation de dérivés fluorescents sous irradiation UV à 366 nm (de couleur bleue dans le cas des coumarines et de couleur rouge orangé à violet ou rose dans le cas des dérivées de quinones). C'est la combinaison d'une irradiation UV avec une réaction d'oxydation (peu spécifique) qui permet d'améliorer considérablement la sélectivité de cette réaction (Lemli, 1976).

Les révélateurs de fonctions azotées

Le réactif à la Ninhydrine : Il permet la détection des amines, des acides aminés, des peptides et des protéines. L'azote de ces composés réagit avec la ninhydrine pour former une imine de couleur pourpre (azote primaire) ou orangée (azote secondaire) (Joullié, Thompson et Nemeroff, 1991).

Le réactif de Dragendorff : Il révèle la présence d'hétérocycles basiques et d'alcaloïdes. Il s'agit d'une solution de sels de métaux lourds (iodo-bismuthate de potassium) qui fixe l'atome d'azote des alcaloïdes en milieu acide pour former des complexes de couleur jaune-orange, rouge/noir ou rose (Burgot, 2012; Sreevidya et Mehrotra, 2003).

➤ ***Quelques méthodes spectrophotométriques de quantification***

L'évaluation des sucres totaux par la méthode de phénols-sulfurique

La méthode utilisant le réactif de phénol sulfurique évalue toutes les classes de sucres incluant les mono- / di- / oligo- et polysaccharides, mais également les hétérosides. Le milieu fortement acide (acide sulfurique concentré) entraîne une rupture des liaisons osidiques conduisant à la production de monosaccharides. La déshydratation des monosaccharides produit des dérivés de furfural qui réagissent avec le phénol pour donner des composés chromophores de couleur jaune-doré dont l'absorbance maximale se situe autour de 490 nm.

Méthodes de quantification des composés phénoliques

La méthode de Folin Ciocalteu : Le réactif de Folin-Ciocalteu, de coloration jaune, est un mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). En milieu alcalin (carbonate de sodium), la dissociation d'un proton phénolique mène à un anion phénolate capable de réduire les acides du réactif en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) par des réactions impliquant le transfert d'électrons (Ainsworth et Gillespie, 2007). Ce réactif très populaire est très souvent utilisé en première approche pour l'évaluation des phénols totaux.

Réactif de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) : Basé sur les propriétés chélatantes de $AlCl_3$ ce réactif permet la quantification de flavonoïdes. En effet, il a été démontré que ce réactif forme des complexes stables (jaune) soit avec le carbonyle ($C=O$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavonoïdes (Malesev et Kuntic, 2007).

Le réactif d'Arnou : Cette méthode, basée sur le test d'Arnou (1937), évalue les acides phénoliques appartenant à la sous-famille des hydroxycinnamiques et certains acides hydroxybenzoïques possédant une fonction catéchol (ortho-diphénols). Le réactif d'Arnou est un mélange de nitrite de sodium et de molybdate de sodium en quantité équivalente dans de l'eau. En milieu acide, le nitrite de sodium provoque une nitrosation en para d'une des fonctions phénols. Le molybdate de sodium, de par son activité oxydante, transforme la fonction nitroso ($R-N=O$) en fonction nitro ($R-NO_2$) et le passage en milieu alcalin conduit à une délocalisation des électrons qui produit une coloration rouge-brun.

Méthode du butanol-acide pour le dosage des tanins condensés : Le clivage oxydatif des proanthocyanidines en milieu acide est généralement utilisé pour quantifier des tanins condensés ou polymère de flavanols. Dans les solutions d'acides minéraux les proanthocyanidols sont clivés pour former des carbocations au niveau des unités « supérieures » et flavan-3-ols dans leur « unité inférieure ». Les carbocations sont immédiatement convertis en anthocyanes par auto-oxydation. La quantification de ces derniers permet une estimation des proanthocyanidols d'un échantillon. Dans le cas de procyanidines, du cyanidol de couleur rouge est produit. Une couleur rouge-orange est formée avec des propelargonidols, et du mauve, du violet ou du bleu est formée lorsqu'il s'agit de prodelphinidols. Dans des conditions appropriées, cette réaction peut être interceptée par du toluène- α -thiol pour produire des flavanyl-4-thio-éthers qui sont largement utilisés dans l'élucidation de la structure de proanthocyanidines (Rohr, 1999).

La méthode de DMACA (*p*-Diméthylaminocinnamaldehyde) : L'activation de la fonction carbonyle de ce réactif en milieu fortement acide (protonation de l'oxygène du carbonyle) conduit à la formation d'un carbocation électrophile. Cet intermédiaire peut ainsi réagir avec des composés phénoliques qui présentent un motif phloroglucinol ou de type résorcinol comme dans les proanthocyanidols. Il a été démontré que le test au DMACA s'avère plus sensible et, de surcroît, plus sélectif (Shahidi et Naczki, 2011).

Évaluation des anthocyanines par différentiel de pH : Le principe est que les anthocyanes changent de couleur de manière réversible avec un changement de pH. Ceci permet de les détecter facilement juste en modifiant le

pH du milieu. La forme oxonium est de couleur vive (fonction de la structure) à pH 1,0 alors que la forme hémiacétal incolore prédomine à pH 4,5. La différence d'absorption entre ces formes à 520 nm est proportionnelle à la concentration des anthocyanes. Les anthocyanes issus de la dégradation des polymères de proanthocyanidols ont une couleur indépendamment du pH car ils absorbent à pH 4,5 ainsi qu'à pH 1,0 (Lee, Durst et Wrolstad, 2005). Ils ne sont donc pas inclus dans cette détermination.

Dosage des tanins hydrolysables par la rhodanine : Les tanins hydrolysables, comme les gallotannins, libèrent de l'acide gallique après hydrolyse. Ce dernier réagit avec la rhodanine pour former un complexe de couleur rosée détecté par spectrophotométrie à 520 nm. Ce réactif permet donc une évaluation de la quantité de tanins hydrolysables dans les extraits naturels (Sieniawska et Baj, 2017).

Méthodes de quantification des protéines

Il existe plusieurs méthodes de quantification des protéines. Nous avons choisi de présenter deux d'entre elles qui sont fréquemment mentionnées dans la littérature.

Méthode de Bradford : Le maximum d'absorbance d'une solution acide contenant du Coomassie Brilliant Blue G-250 passe de 465 nm à 595 nm lorsqu'il se lie à des protéines. Ce réactif présente l'avantage d'être compatible avec la plupart des sels, des solvants, des tampons, des thiols, des substances réductrices et des agents métalliques rencontrés dans des échantillons de protéines. Par contre, il n'évalue que les peptides et les protéines de plus de 3000 kDa (Krohn, 2001).

Méthode du BCA (Bicinchoninic Acid) : Le BCA combine la réduction du biuret classique (réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par la protéine dans un milieu alcalin) avec une détection de Cu^+ hautement sensible et sélective par l'usage de l'acide bicinchoninique. C'est en effet la chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux qui produit la réaction colorée pourpre proportionnelle à la concentration de protéines à 562 nm. Le principal avantage de cette méthode de dosage est qu'elle est compatible avec la plupart des tensioactifs (Krohn, 2001).

1.3.1.2.2.4 Méthodes de quantification des stéroïdes

La méthode de *Liebermann-Burchard* permet non seulement de détecter des stéroïdes présents dans un échantillon mais également de les quantifier. En présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré, la déshydratation de la fonction phénol des stéroïdes permet la formation d'un système conjugué de couleur bleu-vert dont l'absorbance peut être lue à 550 nm (Xiong, Wilson et Pang, 2007).

1.3.2 Méthodes de séparation et de purification

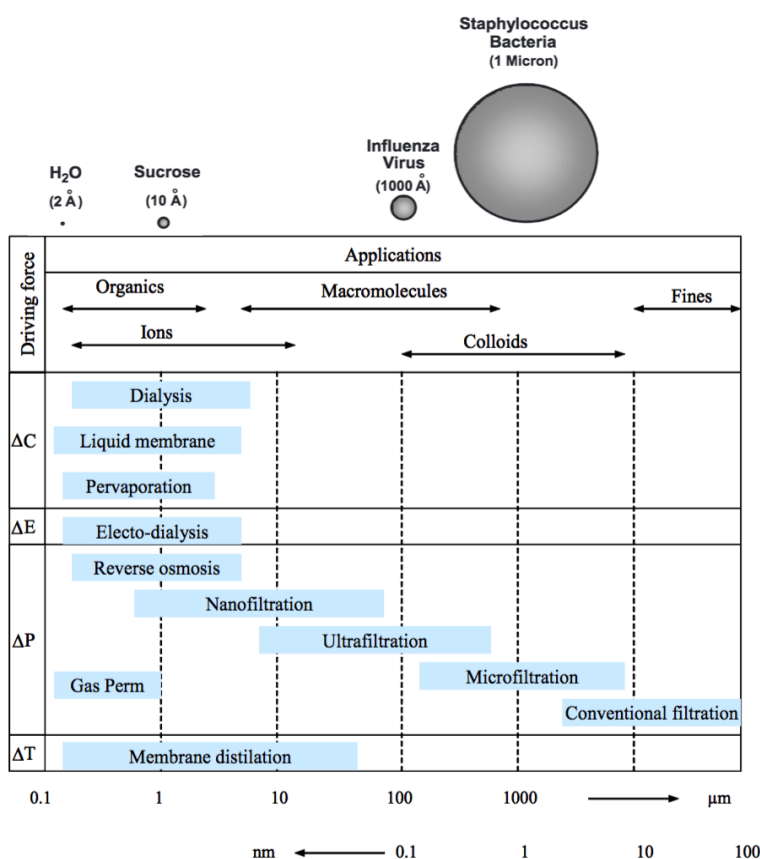
1.3.2.1 Partition solvant / solvant

Le partitionnement par solvant est indéniablement la première étape couramment utilisée pour la séparation de différents groupes de composés à partir d'extraits bruts. Cette technique implique l'utilisation d'un système de deux solvants non miscibles dans une ampoule à décanter dans laquelle les composés se répartissent en fonction de leurs différents coefficients de partage. Habituellement, cette technique de pré-

purification s'effectue avec des solvants de polarité croissante. Un exemple de partition liquide / liquide typique d'un extrait de produit naturel débute avec le recouvrement des composés les plus apolaires (terpènes et lipides) dans une partition avec du n-hexane ou de l'éther de pétrole. Ensuite l'extrait brut est successivement lavé avec du dichlorométhane (CH₂Cl₂), de l'acétate d'éthyle (EtOAc) et du n-butanol (n-BuOH) pour donner trois fractions correspondantes. Bien que le procédé de séparation par partitionnement liquide ait fait ses preuves dans la séparation de grandes classes de composés en fonction de leur polarité, la faible sélectivité et l'utilisation de grande quantité de solvants souvent toxiques restent ses principales limites (W. P. Jones et Kinghorn, 2012).

1.3.2.2 Séparations membranaires

Les procédés membranaires occupent une part importante dans les technologies de concentration et de séparation du fait des nombreuses applications qu'ils offrent en contrôlant le taux de perméabilité des espèces chimiques à travers des membranes (Charcosset, 2006). La perméabilité de ces membranes est donc fonction de la nature de ces derniers, mais également de la taille des pores. Ainsi, en fonction des éléments retenus par ces membranes, les principales techniques utilisant la perméabilité membranaire sont présentées dans la **figure 1.36**.



Adapté de Shon et al. (2013) ©

ΔC (Différence de concentration), ΔE (Différence de potentiel électrique), ΔP (Différence de pression), ΔT (Différence de température de la vapeur).

Figure 1. 36 Les différentes technologies membranaires de séparation.

Simple à mettre en place et peu coûteuses, ces techniques sont largement employées dans le domaine des produits naturels car elles permettent d'enrichir des composants cibles ou éliminer sélectivement des ingrédients indésirables (Saxena, Tripathi, Kumar et Shahi, 2009). Les séparations membranaires sont réalisées à température ambiante, donc spécialement appropriées pour les molécules thermosensibles et permettent d'obtenir des produits de qualité (Baker, 2012).

1.3.2.3 Séparations chromatographiques

La chromatographie est la science qui étudie la séparation des molécules en fonction de leurs différences structurales. Cette méthode physico-chimique est utilisée non seulement pour étudier la composition chimique de mélanges complexes (chromatographie analytique) mais sert également à les séparer et les purifier (chromatographie préparative). La séparation des composantes de l'échantillon se fait en fonction des interactions (plus ou moins fortes) que ces derniers créent avec deux phases non miscibles (stationnaires et mobiles). Ainsi, les composés migrent à des vitesses différentes de sorte que même des molécules chimiquement proches peuvent être séparées les unes des autres (Debenedetti, 2009).

La phase mobile peut être un gaz fluide ou un liquide qui se déplace par gravitation, capillarité ou pression. Il est responsable du transport des composés le long de la phase stationnaire. La phase stationnaire peut être un solide (poreux ou non), ou un liquide immobilisé à la surface d'un support et tente de retenir les molécules transportées dans la phase mobile (Dettmer-Wilde et Engewald, 2014).

Les techniques de chromatographie pourraient être classées en fonction du conditionnement de la phase stationnaire (chromatographie planaire ou sur colonne), selon l'état physique de la phase mobile (chromatographie en phase liquide ou gazeuse) ou en tenant compte des mécanismes permettant la séparation des molécules (interaction hydrophile ou adsorption, interaction hydrophobe ou partition, exclusion stérique et échange ionique) (Debenedetti, 2009). Nous avons choisi de présenter les techniques chromatographiques en fonction de l'état physique de la phase mobile (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3 : Les principales techniques de chromatographie utilisées en chimie des produits naturels

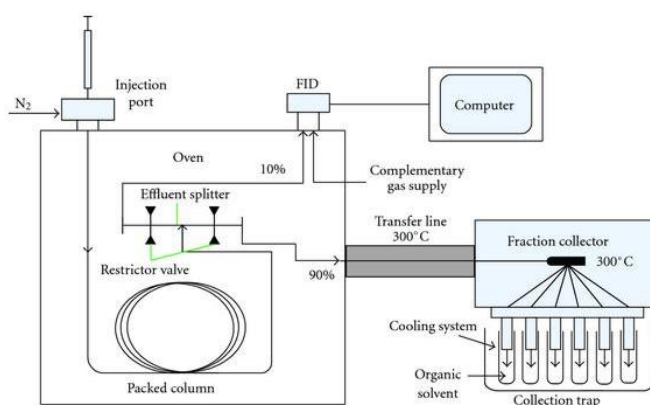
Phase mobile	Phase stationnaire	Techniques
Gazeuse	Solide	Chromatographie en Phase Gazeuses
	Liquide	
Liquide	Liquide	Chromatographie de Partage Centrifuge (CPG)
		Chromatographie à Contre-Courant (CCC)
	Solide ()	Chromatographie sur Couche mince (CCM)
		Chromatographie sur Colonne ouverte (CC)
		Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)
		Chromatographie Flash (FC)
		Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)
		Chromatographie Liquide ultra Performance (UPLC)

➤ **Chromatographies en phase gazeuse (GC, Gas chromatography)**

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est le nom commun désignant les techniques chromatographiques dans lesquelles la phase mobile est du gaz. Cette technique est surtout adaptée pour analyser les composants volatils d'un mélange. L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de la colonne capillaire et le flux d'un gaz inerte (azote ou hélium) est utilisé comme phase mobile pour séparer les molécules. Cependant, il est possible d'analyser des composés polaires en GC après dérivation (Forgács et Cserhádi, 2003).

Le couplage de la spectrométrie de masse à un détecteur à ionisation de flamme (FID, *flame ionization detector*) permet de caractériser les composés séparés (aspect qualitatif par comparaison d'index de rétention et spectres de masse dans une librairie) ou de les quantifier. (López, Dambolena, Zunino et Zygadlo, 2009; Rahman et al., 2015)

Récemment, des techniques préparatives associant un système de collecte de fractions (**Figure 1.37**) issues de la chromatographie en phase gazeuse ont été développées. (Özek et Demirci, 2012)



Adapté de Yang et al. (2011) ©

Figure 1.37 : Chromatographie en phase gazeuse avec système de collecte.

➤ **Chromatographies en phase liquide (LC, Liquid chromatography)**

Chromatographies Liquide / Liquide

La technologie des chromatographies « à contre-courant (CCC) » regroupe l'ensemble des chromatographies dont les phases (stationnaire et mobile) sont liquides. Ces techniques de séparation sont bien adaptées pour la séparation et la purification des produits naturels en préparative. La séparation des composés se fait en fonction de leur coefficient de partage entre les deux phases comme dans le cas du partitionnement liquide (Ghisalberti, 2007).

Concernant le dispositif en lui-même, la colonne de CCC est constituée d'un long tube inerte (généralement en téflon et de plus de 100 m de longueur) enroulé autour d'un support (rotor ou bobine). La rotation du tube crée une force centrifuge qui maintient la phase stationnaire liquide sous forme de couche mince sur les parois du tube. Il existe deux variantes d'appareillage pour la chromatographie à contre-courant qui sont fonction du support (rotor) (Xiao, Lei, Hengqiang et Xiaojing, 2013).

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) qui regroupe l'ensemble des appareillages fonctionnant avec une bobine est statique. La seconde variante de cette technologie utilise une bobine en rotation qui permet un déplacement beaucoup plus rapidement de la phase mobile (Ito, 2014). C'est sur cette base que fonctionne la chromatographie à contre-courant haute vitesse (HSCCC, *High Speed Counter-Current Chromatography*).

L'absence d'adsorption irréversible, la récupération complète de l'échantillon injecté, le faible risque de dénaturation de l'échantillon, la faible consommation de solvants et le rapport efficacité / coût d'investissement initial dans l'appareillage, sont les principaux arguments avancés par les utilisateurs de cette technologie (Sticher, 2008).

Chromatographies Liquide / Solide

Compte tenu de la diversité des méthodes chromatographiques Liquide / Solide rapportées dans la littérature nous nous sommes focalisés sur celles utilisées au cours de nos travaux.

Chromatographies sur couche mince (CCM) : c'est la technique de chromatographie planaire la plus populaire. Cette technique de séparation permet l'étude d'une large gamme de composés chimiques contenus dans des mélanges complexes comme ceux d'extrait naturel (Gibbons, 2012).

Appliquée sur un support de verre, d'aluminium ou de feuille en plastique, la phase stationnaire ou plaque de CCM est généralement constituée par une couche mince (0,10 à 0,25 mm d'épaisseur) de silice, de la cellulose, d'oxyde d'aluminium ou de polyamide. Dissous ensuite dans un solvant approprié, l'échantillon est appliqué sous forme de taches ou de bandes le long d'un côté de plaque, à environ 1 cm du bord (Wall, 2005c). L'éluant placé dans une chambre de saturation circule par capillaire à travers la phase stationnaire, entraînant ainsi avec lui les composés de l'échantillon. Chaque composé peut être caractérisé par la suite en fonction de son rapport frontal (Rf) ou facteur de rétention défini par le rapport $R_f = D_c/D_s$ où D_c est la distance parcourue par le composé et D_s celle parcourue par le solvant ou hauteur du front de solvant (Wall, 2005b). À l'exception des colorants naturels, très peu de composés naturels sont directement visibles sur les plaques de CCM. L'observation sous lampe UV (254nm et /ou 366 nm) et l'utilisation de révélateurs sont souvent utilisées pour mettre en évidence les composés séparés (Wall, 2005a).

L'utilisation de particules de petites tailles pour la phase stationnaire a permis l'avènement de la chromatographie en couche mince haute performance (HPTLC, *High Performance Thin-Layer Chromatography*). Cet outil a rajouté une nouvelle dimension à la CCM en améliorant de près de dix (10) sa précision et sa reproductibilité, tout en réduisant les temps d'analyse, les quantités de phase stationnaire et d'éluant utilisées (Wall, 2005c).

Enfin, la subjectivité de la perception des couleurs et intensités des composés séparés était à l'origine d'une faible reproductibilité des analyses par CCM. Cependant, l'ère du numérique à travers des outils de traitement d'images qui convertissent les taches révélées en pics d'intensité mesurables, a profondément révolutionné la CCM qui reste encore aujourd'hui, l'outil de prédilection lors des études exploratoires. Chromatographie liquide sur colonne ouverte : Il s'agit de la technique de chromatographie la plus utilisée pour concentrer ou purifier des molécules présentes dans un extrait. La colonne préparative classique est constituée d'un tube de verre de 10 à 100 mm de diamètre et de 10 cm à 1 m de hauteur. Le mélange à analyser est chargé au-dessus de la colonne contenant la phase stationnaire adaptée aux molécules à séparer. L'éluant ou phase mobile passe lentement à travers la colonne sous l'effet de la gravité et les constituants du mélange sont retenus différemment par la phase stationnaire provoquant ainsi leur séparation (Ghisalberti, 2007).

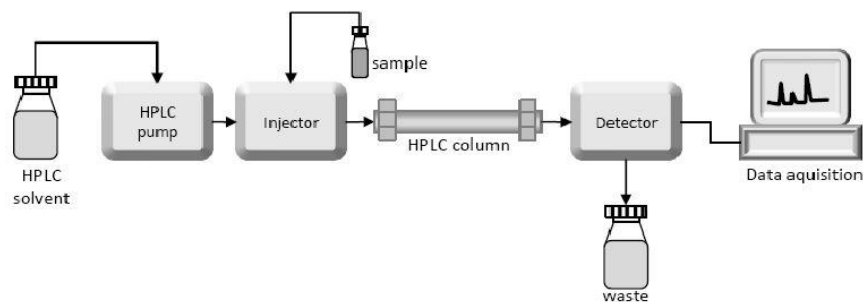
Des phases stationnaires aussi diverses par leur nature que par la taille des particules sont disponibles sur le marché. Par exemple, des polymères de styrène-divinylbenzène (XAD, HP, SP résines) sont souvent utilisés pour la concentration ou la séparation de différentes classes de produits naturels. Aussi, lors d'un processus de purification de molécule, la silice et ses dérivés greffés (cyano, amino,...) sont généralement utilisés en première approche. Les techniques de chromatographie d'exclusion stérique utilisant des gels de polyacrylamide ou du dextran réticulé (Sephadex LH 20) sont quant à elles utilisées plutôt pour affiner la purification dans ses dernières étapes (Sticher, 2008).

Chromatographie liquide sous pression : Cette section couvre l'ensemble des techniques de chromatographie analytique ou préparative sur colonne, dans lesquelles une pression de plus de 2 bars est appliquée par l'intermédiaire d'une pompe. Ainsi, il est possible de distinguer des chromatographies à basse pression (jusqu'à 5 bars), à moyenne pression (5-20 bars) et à haute pression (> 20 bars) qui sont étroitement liées à la granulométrie de la phase stationnaire utilisée (Ghisalberti, 2007). En effet, les supports de plus faibles granulométries nécessitent de fortes pressions pour éluer la phase mobile à travers la colonne (Sticher, 2008). Les techniques les plus utilisées en chimie des produits naturels sont la Chromatographie Flash (FC, *Flash Chromatography*) et la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*)

Dans un système de chromatographie flash, l'éluant est rapidement poussé à travers une courte colonne sous la pression d'un gaz (généralement de l'air comprimé). Les colonnes contiennent des phases stationnaires de nature diverse dont la taille des particules varie entre 10 et 60 μm . Cette technique est utilisée en préparative et fournit un fractionnement préliminaire rapide des mélanges complexes. Le FC est devenu une technique de routine fréquente qui offre une solution abordable, simple, rapide et pratique pour la purification de composés organiques (Sticher, 2008).

Dans la littérature, les termes « HPLC-analytique », « HPLC semi-préparative (semi-prép) » et « HPLC préparative » sont utilisés en fonction de la quantité d'échantillon injectée. En effet quelques microgrammes de ce dernier sont nécessaires en analytique alors que pour l'isolement, la semi-préparative (1-100 mg) et la préparative (supérieur à 100 mg) sont couramment utilisées. L'utilisation de HPLC est devenue un élément essentiel de l'isolement de la plupart des classes de produits naturels du fait de sa robustesse, de sa polyvalence

et sa rapidité (Sticher, 2008). Avec une granulométrie comprise entre 3 et 10 μm , l'HPLC fournit des surfaces d'interaction plus importantes, donc une puissance en résolution souvent nécessaire à la séparation des mélanges de produits naturels complexes (Ghisalberti, 2007). Un système HPLC (**Figure 1.38**) se compose d'une colonne qui contient la phase stationnaire, de pompes qui déplacent la (les) phase (s) mobile (s) à travers la colonne et un détecteur qui montre les temps de rétention des molécules séparées. Les temps de rétention varient en fonction des interactions entre la phase stationnaire, les molécules analysées et les éluants (solvants) choisis.



Adapté de Czaplicki (2013) ©

Figure 1.38 : Les différentes composantes de l'HPLC.

Le début des années 2000 a vu l'arrivée sur le marché de colonnes polyvalentes qui ont donné naissance à la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). Ces dernières permettent de séparer des composés très polaires en utilisant des solvants polaires, fournissant ainsi une approche alternative et efficacement pour ces molécules (protéines et sucres) (Buszewski et Noga, 2012). Il est également important de noter que basée sur le même principe que l'HPLC analytique, une nouvelle génération d'instrumentation utilisant des phases stationnaires de granulométrie inférieure à 2 μm détrône peu à peu ce dernier depuis une dizaine d'années. Il s'agit de l'UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) qui permet d'effectuer des séparations de haute résolution en utilisant des pressions pouvant aller jusqu'à 1000 bars (Swartz, 2005).

1.3.2.4 Séparation par électrophorèse

Basée sur les mêmes principes que la chromatographie, l'électrophorèse permet la séparation de composés chargés sous l'influence d'un champ électrique. C'est le caractère polaire et amphotérique des composés contenant de l'azote (acides aminés, peptides, protéines, acides nucléiques et nucléotides) qui permet leur séparation en fonction du pH du milieu. Placées sur un support (gel d'agarose ou de polyacrylamide) sous un champ électrique, ces molécules en fonction de leur charge puis de leur taille migrent vers la cathode (-) ou l'anode (+). Les composés séparés peuvent ensuite être révélés par de simples réactifs (ions argent, bleue de coomassie) ou en utilisant des anticorps spécifiques (Immunoélectrophorèse ou immunofixation). L'électrophorèse est une méthode de séparation très utilisée en biochimie et en biologie moléculaire du fait de sa simplicité, de sa rapidité et elle constitue très souvent une étape clé dans la réalisation d'autres méthodes d'exploration plus complexes (western blot par exemple) (Reddy et Raju, 2012).

1.3.3 Les méthodes de caractérisation et d'identification

L'identification de molécules implique l'accumulation de données d'analyses provenant de nombreuses sources, chacune fournissant des informations structurales rigoureusement et exclusivement d'une structure chimique. Les instruments spectroscopiques, comme les spectroscopies d'absorption ultraviolette (UV), visible (Vis) et infrarouges (IR), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS) représentent actuellement la base des déterminations structurales (**Tableau 1.4**). La polarimétrie et la cristallographie peuvent également être nécessaires pour une caractérisation complète surtout lorsque des ambiguïtés persistent sur la structure chimique des molécules étudiées (Molyneux et Colegate, 2007).

Le développement et l'application des approches dite « couplées » (HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-MS, GC-FID, HPLC-DAD-MS, HPLC-RMN, HPLC-DAD-MS-RMN, etc.) ont considérablement accéléré les déterminations de structure dans les mélanges complexes. Cela s'est avéré particulièrement précieux dans le domaine de la **déréplication**, où les molécules d'un mélange se voient attribuer des structures provisoires du fait de leurs caractéristiques spectrales similaires à celle de composés déjà décrits dans la littérature ou par le biais d'une comparaison avec des standards (Molyneux et Colegate, 2007).

Tableau 1. 4: Caractéristique des détecteurs les plus utilisées en chromatographie liquide.

Détecteurs	Réponse	Sensibilité	Application
UV- Vis	Sélective	ng	Composés présentant des insaturations (doubles et triples liaisons)
Indice de Réfraction / Diffusion de lumière	Universelle	µg / ng	Universelle
Fluorescence	Sélective	pg	Aflatoxines et acides aminés dérivés
Electrochimie / conductivité	Sélective	pg / ng	Acides aminés, espèces ioniques, catécholamine, peptides
Spectrométrie masse	Universelle	fg - ng	Universel
RMN	Universelle	mg	Universelle

Réalisé à partir des données de Swartz (2010).

La détection des composés séparés apparaît donc, comme de fait aussi important que la technique de séparation en elle-même. Les techniques de détection les plus couramment associées aux techniques de séparation sont l'absorbance ultraviolet et visible, la fluorescence, l'indice de réfraction, l'électrochimie, la conductivité, la diffusion de lumineuse, la masse et plus récemment la résonance magnétique nucléaire. Le choix du type de détecteur dépend essentiellement de la nature des composées séparées (Wilson, 2009).

➤ La détection par absorbance ultraviolette et visible

Les spectrophotomètres UV/VIS (enregistrement des chromatogrammes à une longueur d'onde choisie) et les PDA/DAD (*Photodiode Array Detector*, enregistrement des spectres d'absorption des molécules détectées) sont les deux types de détecteurs décrits dans la littérature. Malheureusement, pour être détectés les

composés doivent présenter des maxima d'absorption supérieurs à ceux des solvants utilisés comme phase éluante (c'est à dire généralement au-dessus de 205 nm). De toute évidence, une grande majorité de composés naturels par exemple, les sucres, la plupart des acides aminés ou les acides aliphatiques de faibles poids moléculaires ne peuvent être détectés distinctement en absorbance ultraviolet – visible (Markowski et Waksmundzka-Hajnos, 2010; Wilson, 2009).

➤ **La détection par spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique basée sur la séparation d'ions en phase gazeuse sous un vide en fonction de leurs rapports masse / charge (m/z). Les molécules analysées doivent donc être d'abord ionisées, formant des ions (pseudo)moléculaire selon la technique d'ionisation utilisée. Si l'ion (pseudo)moléculaire reçoit une énergie suffisante, il subit des fragmentations supplémentaires. Tous ces ions formés sont séparés et détectés dans le spectromètre de masse selon leur m/z . Un spectre de masse de la molécule est alors produit et représente une distribution des abondances (axe des ordonnées) des ions par rapport à leurs valeurs m/z (axe des abscisses). L'ion (pseudo)moléculaire présente la valeur de m/z la plus élevée et le pic de base la plus haute intensité dans le spectre (Hajslova, Mastovska et Cajka, 2008).

D'un point de vue dispositif, le spectromètre de masse se compose donc de 3 parties fondamentales qui sont : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

Il existe plusieurs méthodes d'ionisation. Les plus couramment citées dans la littérature sont l'impact électronique (EI, *Electronique Impact*), ionisation chimique (CI, *Chimique Ionisation*), ionisation par électrospray (ESI, *Electro-Spray Ionisation*), le bombardement par des atomes rapides (FAB, *Fast atom bombardment*) et la désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*). Le choix de la méthode d'ionisation dépend de la polarité, du poids moléculaire, de la thermolabilité et de la complexité de l'échantillon à analyser.

Les ions produits sont ensuite extraits dans l'analyseur où ils sont accélérés et séparés dans un champ électrique ou magnétique. De nos jours, une large gamme d'analyseurs de masse sont disponibles et le choix du plus adapté prend en compte la taille des composés analysés, la résolution et la précision des spectres attendus et bien évidemment les moyens financiers disponibles (jusqu'à 2 millions de dollars pour les plus performants). Nonobstant tous ces critères, les analyseurs peuvent également être regroupés en deux grandes catégories selon l'usage désiré. La première concerne les analyseurs quadruples (Q), les triples quadruples (QQQ) et les pièges à ions (*quadrupole Ion Trap 3D, Linear Ion Trap 2D*) qui sont des instruments de balayage utilisés en mode « scan » ou en « tandem (MS/MS) » pour la confirmation de structures connues (en comparaison avec la littérature ou des standards) ou pour la quantification. Les analyseurs à temps de vol (TOF, *Time-of-flight*), celui de résonance cyclotron à ionisation de Fourier (FT - ICR, *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) et l'*Orbitrap* représentent la seconde catégorie d'instruments sans balayage. Par contre, la haute résolution et la précision des spectres de masse fournies par de tels systèmes réduisent considérablement le nombre de possibilités les structures ayant des formules brutes identiques. Une simple association des temps de rétention en chromatographie pourrait être suffisante à l'identification des structures inconnues lorsque des analyseurs

de ce type sont utilisés. Il existe depuis quelques années des systèmes hybrides qui combinent plusieurs types d'analyseurs en série (Q-TOF, Q-LIT, TOF-TOF...).

Enfin, le détecteur amplifie le courant ionique arrivant et enregistre les données sous la forme de spectres de masse. Les types de détecteurs les plus utilisés incluent le multiplicateur d'électrons, le multiplicateur de photons et le détecteur à galette de micro-canaux (MCP, *Micro-Channel plate*)

Le caractère universel d'un tel détecteur et les immenses possibilités qu'il offre en couplage avec les techniques de chromatographie en fait un outil quasiment indispensable dans l'analyse structurale des produits naturels (Stecher et al., 2010).

➤ *Analyse par Résonance nucléaire magnétique*

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'une des techniques de caractérisation structurales les plus puissantes utilisées pour étudier la structure et certaines propriétés des molécules. Les signaux de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont obtenus avec des noyaux ayant un spin non nul comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F et ^{31}P . Ces expériences sont systématiquement utilisées pour élucider les structures des produits naturels et peuvent être classées en deux grandes catégories (Cooper et Nicola, 2014).

Techniques RMN unidimensionnelles (1D)

Les deux expériences de RMN les plus élémentaires sont celle du proton ($^1\text{H-NMR}$) et celle du carbone ($^{13}\text{C-NMR}$) qui déterminent respectivement la fréquence de résonance des noyaux ^1H ou ^{13}C dans une molécule. Les expériences de $^1\text{H-NMR}$ enregistrent les déplacements chimiques (δ , en ppm) et les constantes de couplage de spin-spin (J en Hz). Cela fournit des informations précieuses sur le nombre d'hydrogènes et leur agencement entre eux au sein d'une molécule. Les données de $^{13}\text{C-NMR}$ sont utilisées pour compléter les données de proton et sont particulièrement utiles pour établir le type de groupes présents dans une molécule (CH_3 , $\text{C}=\text{O}$, COOH , $\text{C}=\text{C}$,...). Par contre il faut noter que ces dernières sont beaucoup moins sensibles (abondance de ^{13}C égale à 1,1% comparativement à ^1H qui est de 99,9%). L'association des deux expériences de RMN en comparaison avec les données disponibles dans la littérature peut permettre de confirmer la nature de structures chimiques. Mais une élucidation structurale définitive qui précise l'emplacement précis des différents groupes fonctionnels nécessite diverses expériences en 2D

Techniques RMN bidimensionnelles (2D)

Les expériences de RMN en 2D génèrent des cartes qui indiquent les corrélations entre différents noyaux dans une molécule. Ainsi, selon que les noyaux en interaction soient identiques ou différents, il est possible d'établir des relations de voisinage H-H et C-C (homonucléaires), mais également C-H (hétéro-nucléaire) au sein d'une molécule. Le COZY (*CORrelation Spectroscopy*) par exemple permet de mettre en évidence des relations entre des protons séparés par deux liaisons ($^2\text{J}_{\text{H-H}}$) et même parfois trois liaisons ($^3\text{J}_{\text{H-H}}$) voir quatre liaisons ($^4\text{J}_{\text{H-H}}$). Le TOSCY (*TOTAL Correlation Spectroscopy*) est parfois utilisé pour observer des liaisons H-H dans des composés présentant plusieurs liaisons osidiques. Les techniques HMQC (*Heteronuclear Multiple*

Quantum Coherence) et la HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) sont de puissantes techniques intégrant directement les données RMN du proton et du carbone. Ces techniques établissent les corrélations entre les protons d'une molécule et les carbones auxquels ils sont attachés ($^1J_{C-H}$). Les expériences de HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) quant à elles présentent les interactions de longue distance, c'est à dire $^2J_{C-H}$ et $^3J_{C-H}$. Il faut également souligner que des techniques de RMN comme le NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) et le ROESY (*Rotating Overhauser Effect Spectroscopy*) peuvent être sollicitées pour mettre en évidence des relations au niveau spatial ou pour établir des stéréochimies.

Traditionnellement, de grandes quantités d'échantillons parfois difficiles à obtenir, surtout dans le cas des produits naturels, sont nécessaires pour le développement de ces techniques de RMN. Cependant ces dernières décennies, une amélioration des performances permettent de produire sur certains instruments, des spectres de proton et de carbone avec des échantillons de l'ordre de 1 mg (Pedro et Gonalo, 2012). Il faut aussi noter parmi les avancées majeures de cette technologie, la possibilité de réaliser des couplages avec la chromatographie liquide qui devient de plus en plus populaire. Malheureusement, le coût exorbitant de cette technologie reste sa principale limite (Elipe et Victoria, 2011; Markowski et Waksmundzka-Hajnos, 2010; Sarker et Nahar, 2012b).

2. Les extractibles de l'érable

Depuis plus d'un siècle, la systématique de la famille Sapindacée au sein de l'ordre des Sapindales a mis au défi les taxonomistes. Basées principalement sur leur morphologie, les Sapindacées étaient traitées comme distincts de deux familles étroitement apparentées (Hippocastanacées et les Acéracées) jusqu'à la fin des années 1980. L'avènement de performantes techniques de séquençage d'ADN a permis l'adoption d'un concept plus large d'une seule famille des Sapindacées de plus de 1900 espèces et 142 genres répartis entre quatre sous-familles: Dodonaeoidées, Hippocastanacées (Acéracées et Hippocastanacées), Sapindacées et Xanthoceroïdées (Buerki et al., 2009, 2010).

2.1 Chimio-taxonomie des Sapindacées

D'un point de vue chimique, les saponosides (hétérosides de terpènes et de stéroïdes) sont les constituants caractéristiques des membres de la famille des sapindacées. Des composés phénoliques comme des coumarines, des flavonoïdes, des proanthocyanidines et des tanins hydrolysables ont également été mis en évidence chez les sapindacées. Le genre *Acer* serait particulièrement caractérisé par la présence de dérivés d'acide gallique (gallotanins, galloyl de flavonoïdes et d'anthocyanes) (Bate-Smith, 1977, 1978; S. B. Ji, Saito, Yokoi, Shigihara et Honda, 1992b; S. B. Ji, Yokoi, Saito et Mao, 1992a; Torgils Fossen, 1999).

Chez certaines espèces de cette famille produisant des exsudats résineux, des diterpènes et des triterpènes ont également été mis en évidence. Même si des tests non spécifiques d'alcaloïdes se sont révélés positifs pour grand nombre d'espèces de la famille des sapindacées, seul des bases de purines (la caféine, la théobromine, la théophylline) ont été identifiées en grandes quantités dans le guarana *Paullinia cupana*. Il a également été

rapporté que certaines espèces de sapindacées ont la capacité de produire des métabolites particuliers. Il s'agit notamment d'acides aminés non-protéinogènes et des glucides cycliques de type cyclitol (quebrachitol, 1-inositol). Enfin, des dérivés cyanogènes de type glucidiques et même lipidiques ont été rapportés dans certaines espèces de cette famille et seraient à l'origine de graves intoxications (Acevedo-Rodríguez, Welzen, Adema et Ham, 2010).

2.2 Métabolites et activités biologiques décrites chez *Acer saccharum* et *Acer rubrum*

Du fait de sa grande consommation et de son intérêt commercial, la composition en macro- et micronutriments du sirop d'érable est bien établie. Le saccharose serait le principal glucide (environ 60-66%) mais on y trouve également des polysaccharides de haut poids moléculaire, des minéraux (K, Ca, Mg, Na, Mn, Al, Zn, Fe, etc.), des vitamines (riboflavine, la niacine, thiamine, etc.), et des acides aminés (arginine, thréonine, proline, etc.) (Yuan et al., 2011). Outre ces nutriments, plus de 300 composés ont été identifiés à ce jour dans différentes espèces du genre *Acer*. Parmi ces composés, près de 75% sont de nature phénolique. Ce sont principalement des phénylpropanoïdes (74), des flavonoïdes (60), des phénols et acides phénols (50), des tannins (40), des diarylheptanoïdes (29) et des terpénoïdes et phytostérol (24) (Bi, Gao, et al., 2016).

Le tableau 1.5 résume la centaine de composés mis en évidence dans l'érable à sucre. Décrits pour la plupart dans le sirop et la sève, les composés phénoliques de cette essence sont majoritairement des dérivés de phénylpropanoïdes (Abou-Zaid, Nozzolillo, Tonon, Coppens et Lombardo, 2008; L. Li et Seeram, 2010, 2011b, 2011a, 2012). Les écorces et les feuilles de cette espèce ont également fait l'objet des nombreuses études et là aussi, ce sont des acides phénoliques et des phénylpropanoïdes qui ont largement été découverts (Bi, Gao, et al., 2016; Yuan et al., 2011). Très peu d'études se sont penchées sur la composition chimique des bourgeons d'érable à sucre. A notre connaissance, seul Thakur (1977) a mis en évidence la présence de composés phénoliques qui pourraient être à l'origine de la levée de dormance. En ce qui concerne l'érable rouge (**Tableau 1.6**), une cinquantaine de composés sont connus à ce jour et ont été isolés pour la plupart de l'écorce et des feuilles (Abou-Zaid, Helson, Nozzolillo et Arnason, 2001; Wan, Yuan, Li, et al., 2012; Yuan, Wan, Liu et Seeram, 2012). De nature phénolique pour la grande majorité aussi, ces composés sont essentiellement des dérivés d'acides phénoliques (acide gallique en particulier) et de flavonoïdes. Ceux-ci diffèrent donc de molécules décrites au paravent pour l'érable à sucre. La littérature scientifique ne mentionne aucune étude réalisée sur les bourgeons d'érable rouge jusqu'à ce jour.

Tableau 1.5: Liste des composés identifiés dans *Acer saccharum* (Érable à sucre)

Nature chimique	Composés	Références
Phénols, Acides phénoliques et dérivés (24)	<i>Gallic acid, 1-O-galloyl-β-D-glucose, γ-resorcylic acid; Vanillic acid; Syringic acid; 3,4,5-trimethoxyphenyl-1-O-β-D-apiofuranosyl- (1→6)-O-β-D-glucopyranoside; 4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl-1-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranoside; koaburside; Trimethyl gallic acid methylester; 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzyl alcohol-4-O-β-D-glucopyranoside; Vanilloside; Saccharumosides B; Saccharumosides C; Saccharumosides D; Catechaldehyde; Vanillin; Syringaldehyde; 4-Acetylcatechol; 3',4',5'-Trihydroxyacetophenone; 3,4-Dihydroxy-2-methylbenzaldehyde; 2-Hydroxy-3',4'-dihydroxyacetophenone; 1-(2,3,4-Trihydroxy-5-methylphenyl)ethanone; 2,4,5-Trihydroxyacetophenone; 4-(Dimethoxymethyl)pyrocatechol;</i>	(L. Li et Seeram, 2011a) (Abou-Zaid et al., 2008) (Zhang et al., 2014) (Li and Seeram, 2010)
Phénylpropanoïdes (52)	<i>Secoisolariciresinol; (±)-Syringaresinol; syringaresinol-β-D-glucopyranoside; Buddlenol E; (1S, 2R)-2-[2,6-Dimethoxy-4-[(1S,3aR,4S,6aR)-tetrahydro-4-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1h,3h-furo[3,4-c]furan-1-yl]phenoxy]-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol; 5-(3'',4''-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-3-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzyl)-4-(hydroxymethyl)dihydrofuran-2-one; [3-[4-[(6-Deoxy-α-L-mannopyranosyl)oxy]-3-methoxyphenyl]methyl]-5-(3,4-dimethoxyphenyl)dihydro-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2(3h)-furanone; 5-(3'',4''-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-3-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzyl)-4-hydroxymethyl-dihydrofuran-2-one-4'-O-α-L-rhamnopyranoside; Saccharumosides A; Saposides B; Saposides A; Threo-2-[4-[2,3-Dihydro-3-(hydroxymethyl)-5-(3-hydroxy-propyl)-7-methoxy-2-benzofuranyl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol; (±)-Sakuraresinol; Icariside E4; Dehydroconiferylalcohol; 5'-Methoxy-dehydroconiferylalcohol; 2-[4-[2,3-Dihydro-3-(hydroxymethyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-2-benzofuranyl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol; Acernikol; erythro-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxy-propyl)-2-methoxy-phenoxy]-1,3-propanediol; Syringenin; (E)-Coniferol; Dihydroconiferylalc. threo-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol; (erythro,erythro)-1-[4-[2-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(hydroxymethyl)ethoxy]-3,5-imethoxyphenyl]-1,2,3-propanetriol; (erythro,threo)-1-[4-[2-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(hydroxymethyl)ethoxy]-3,5-dimethoxyphenyl]-1,2,3-propanetriol; LeptolepisolD; (erythro,erythro)-4'',4'''-dihydroxy-3,3'',3''',3''',5,5'-hexamethoxy-7,9'',7',9'-diepoxy-4,8'',4',8'''-bisoxy-8,8'-dineolignan-7'',7''',9'',9'''-tetraol; threo-Guaiacylglycerol-β-O-4'-dihydroconiferylalc.; erythro-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2,6-di-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol; 2,3-Dihydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-propanone; 2,3-Dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanone; 3-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propan-1-one; (threo,erythro)-4'',4'''-dihydroxy-3,3'',3''',3''',5,5'-hexamethoxy-7,9'',7',9'-diepoxy-4,8'',4',8'''-bisoxy-8,8'-dineolignan-7'',7''',9'',9'''-tetraol; erythro-Guaiacylglycerol-β-O-4'-coniferylalcohol; erythro-Guaiacylglycerol-β-O-4'-dihydroconiferylalcohol; Lyoniresinol; Isolariciresinol; (+)-Sakuraresinol, Quebecol; Cleomiscosin C; Cleomiscosin D; Scopoletin; 5'-Demethylaquillochin, Leptolepisol D, Fraxetin, Isofraxidin; p-coumaric acid; 4-methoxycinnamic acid; caffeic acid; ferulic acid; sinapic acid; chlorogenic acid;</i>	(L. Li et Seeram, 2012) (L. Li et Seeram, 2011b) (Yoshikawa et al., 2013) (Yoshikawa et al., 2011) (Yuan et al., 2011) (Thakur, 1977)
Flavonoïdes (2)	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside; quercetin,	
Terpénoïdes (7)	Phaseic acid; 3-Keton-ursane; 3β-hydroxy-12-olean-12-en; 5-en-7-hydroxy-sitosterol; β-Sitosterol; Daucosterol; Stigmasterol	
Autres (15)	(E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene; 4,4'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxystilbene; 4,4'-Dihydroxy-3,3',5'-trimethoxystilbene; 1,2-Diguaiacyl-1,3-propanediol; Erythro-1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol; Saponol A; p-Tyrosol; D-1-O-Methyl-inositol(Pinitol) quebrachitol; Shikimic acid; 3,4-Dihydro-5-(hydroxymethyl)pyran-2-one; 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-3(2H)-furanone; 5-(Hydroxymethyl)furfural; 4-Methyl-1,2-venzenediol; 4-(Hydroxymethyl)-1,2-benzenediol, inulin	

Tableau 1.6: Nature des composés identifiés dans *Acer rubrum* (Érable rouge)

Nature chimique	Composés	Références
Phénols, Acides phénoliques et dérivés (28)	<i>1-O-galloyl-α-L-rhamnose</i> ; <i>1-O-galloyl-β-D-glucose</i> ; <i>gallic acid</i> ; <i>methyl gallate</i> ; <i>ethyl gallate</i> ; <i>m-digallate</i> ; <i>ethyl m-digallate</i> ; <i>Gallic acid</i> ; <i>3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic 3-O-β-D-glucopyranoside</i> ; <i>3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid methyl ester</i> ; <i>3-Methoxy-4-hydroxyphenol-1-O-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside</i> ; <i>Ginnalin B</i> ; <i>Ginnalin C</i> ; <i>Ginnalin A</i> ; <i>3,6-Di-O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (Gin 3.6)</i> ; <i>Rubrumoside B</i> ; <i>maplexin A</i> ; <i>maplexin B</i> ; <i>maplexin C</i> ; <i>maplexin D</i> ; <i>maplexin E</i> ; <i>maplexin F</i> ; <i>maplexin G</i> ; <i>maplexin H</i> ; <i>Maplexin I</i> ; <i>Ellagic acid</i> ; <i>methyl vanillate</i> ; <i>Methyl syringate</i>	(Bedgood et al., 2005) (Abou-Zaid and Nozzolillo, 1999) (Abou-Zaid et al., 2001)
Phénylpropanoïdes (5)	<i>Rubrumosides A</i> ; <i>Nymphaeoside A</i> ; <i>Fraxetin</i> ; <i>Nortrachelogenin 8'-O-β-D-glucopyranoside</i> ; <i>7,8-dihydroxy-6-methoxycoumarin</i> ;	(Wan et al., 2012)
Flavonoïdes (17)	<i>Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (isoquercitrin)</i> ; <i>2''-O-Galloylquercitrin (quercetin-3-O-α-L-(2''-galloyl)-rhamnoside)</i> ; <i>3''-O-Galloylquercitrin (quercetin-3-O-α-L-(3''-galloyl)-rhamnoside)</i> ; <i>Rutin</i> , <i>Kaempferol 3-O-α-L-rhamnoside</i> ; <i>quercetin 3-O-α-L-rhamnoside</i> ; <i>Kaempferol-3-O-β-D galactopyranoside</i> ; <i>Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside</i> ; <i>Kaempferol-3-O-rutinoside</i> ; <i>(+)-Catechin</i> ; <i>L-Epicatechin</i> ; <i>(-)-Epicatechin-3-O-gallate</i> ; <i>Phloridzin</i> ; <i>ProcyanidinA2</i> ; <i>ProcyanidinA6</i> ; <i>Procyanidindimer</i> ; <i>Procyanidintrimer</i> ;	(Yuan et al., 2012) (Wan et al., 2012b)
Terpénoïdes (1)	<i>β-Sitosterol</i>	
Alcaloïde (1)	<i>Gramine</i>	
Autres (2)	<i>2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methoxy-4h-pyran-4-one</i> ; <i>Citroside A</i>	

Pour finir, des études réalisées sur le sirop d'érable, la sève, l'écorce et les feuilles d'érable à sucre et d'érable rouge ont révélé que des extraits et /ou molécules issus de ces matrices naturelles présentaient de nombreuses propriétés biologiques. Ces essais *in vitro* et *in vivo* résumés dans le **tableau 1.7**, ont montré de nombreuses propriétés, principalement sur la prolifération de cellules cancéreuses (González-Sarrías, Li et Seeram, 2012; González-Sarrías, Ma, Edmonds et Seeram, 2013; González-Sarrías, Yuan, et al., 2012) et le métabolisme glucidique (González-Sarrías, Li, et al., 2012; Honma, Koyama et Yazawa, 2010; H. Ma et al., 2015; Seeram, Xu, Li et Slitt, 2012; Wan, Yuan, Li, et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Au vu de toutes ces propriétés biologiques, des valorisations en thérapeutique (Seeram et al., 2012), comme nutraceutiques (H. Ma, Liu, Dain et Seeram, 2017; Zhang et al., 2014) ou en cosmétiques (H. Ma, Xu, et al., 2017; Seeram, Ma et Parang, 2015) ont été revendiqués pour des extraits issus d'érable rouge et d'érable à sucre. À cet effet, des brevets (CA 2808679A1, US 20130310332A1; US20170029397A1; WO 2015154074A1; WO 2012055010A1; WO 2012021981A1) pour de nombreuses applications ont été déposés.

Tableau 1.7: Quelques exemples d'essais biologiques réalisés sur les 2 espèces d'érables.

Propriétés / Activités	Résultats obtenus	Matériel étudiée
Activité antioxydante	Activité antioxydante du sirop conservé après pasteurisation et stérilisation Tao Yuan et al. 2013	Sirop d'érable
	Activité associée aux fortes teneurs en polyphénols (Jusqu'à 30% selon les organes) Royer et al., 2011	Extrait brute d'écorce d' <i>Acer rubrum</i> , (eau chaude, Ethanol...)
Anti-glycation avancée	Mise en évidence d'activité antiglycation Liu et al. 2017	Sirop d'érable
	Relation structure activité pour des molécules Ma et al. 2016	Gallo-tanin d'érable
Anti –inflammatoire	(E)-3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene purifié du sirop a présenté la meilleure réduction des teneurs en NO• and PGE2 Nahar et al. 2014	Sirop d'érable
Hépatoprotecteur	Réduction de l'expression de gènes codant pour les enzymes à l'origine de la formation d'ammoniac dans le foie pour un groupe de rat traité au sirop d'érable. Watanaba et al. 2011	Sirop d'érable
	Modification de l'expression de gènes hépatiques chez les souris nourries avec un régime alimentaire riche en matières grasses. Kamei et al. 2015	Sirop d'érable
Neuroprotecteur	Réduction de l'inflammation neuronale et de l'aggregation de β -Amyloïde Hawco et al. 2016; Hang Ma et al. 2016	Sirop d'érable
Activité anti-hyperglycémique	Réduction de l'absorption du glucose par inhibition de α -glucosidase Honma et al., 2010; Apostolidis et al., 2011	Maplexins / ginnalins extraits de feuilles d' <i>Acer rubrum</i> , Sève d' <i>Acer saccharum</i>
	Relation structure activité sur α -glucosidase Ma et al. 2015	Gallo-tanin d'érable
	Étude <i>in vivo</i> sur des rats (baisse de la glycémie) Seeram et al. 2012,	Maplexins d'écorce <i>Acer rubrum</i>
	Le sirop d'érable peut avoir un indice glycémique inférieur à celui du saccharose, ce qui peut aider à prévenir le diabète de type 2. N. Nagai, Ito, and Taga 2013	Sirop d'érable
Activité antitumorale	Arrêt de la prolifération de cellules de tumeur (colon HCT-116, du sein MCF-7) González-Sarrías et al., 2013, 2012; Yuan et al., 2011	Maplexins /ginnalins Ecorce, sève, feuilles et sirop <i>Acer saccharum</i> et <i>Acer rubrum</i>
Antimicrobien	Concentration minimale inhibitrice inférieur ou égale à 1 mg/mL pour <i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>S. aureus</i> 05-3 (MRSA), <i>S. epidermidis</i> ATCC12228, <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Salmonella typhi</i> H901. D. Wu et al. 2010	Extrait hydro-alcoolique (50%) de feuilles d' <i>Acer saccharum</i> et <i>Acer rubrum</i>
Toxicité	Anémie hémolytique, méthémoglobinémie, formation de corps de Heinz chez les chevaux Dewitt, Bedenice, and Mazan 2004; Alward et al. 2006	Feuilles d' <i>Acer rubrum</i>
	Acide gallic et le 2,3 -dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthoxy-4h-pyran-4-one responsables des effets toxiques <i>in vitro</i> sur les érythrocytes du cheval Boyer, Breeden, and Brown 2002	extraits d' <i>Acer saccharum</i> et <i>Acer rubrum</i>

CHAPITRE 3 : STRESS OXYDANT ET POUVOIR ANTIOXYDANT

1. Oxydation en milieu biologique

L'oxydation se définit comme un transfert d'électrons (ou d'un hydrogène) d'une entité chimique à une autre. Ces réactions constituent une part essentielle du métabolisme cellulaire. Cependant, lors de transferts d'électrons non appariés, l'oxygène, élément indispensable à la vie aérobie, peut donner naissance à une multitude d'espèces chimiques très réactives, sous forme de radicaux libres ou non (**Tableau 1.8**) (Gülçin, 2012)

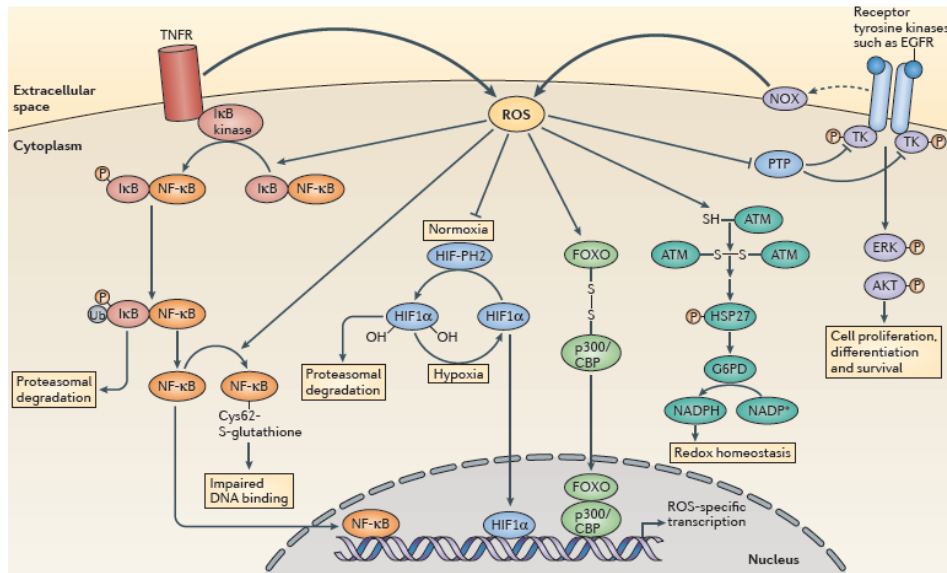
Tableau 1.8: Les espèces oxygénées réactives des milieux biologiques

Radicaux libres		Espèces réactives non radicalaire	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Peroxide d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	HO^{\bullet}	Oxygène singulet	1O_2
Radicale hydroperoxyde	HOO^{\bullet}	Ozone	O_3
Radical lipide	L^{\bullet}	Lipide hydroperoxide	$LOOH$
Radical lipide peroxyde	LOO^{\bullet}	Hypochlorite	$HOCl$
Radical peroxyde	ROO^{\bullet}	Peroxy nitrite	$ONOO^{\bullet}$
Radical lipide alkoxyde	LO^{\bullet}	Trioxyde d'azote	N_2O_3
dioxyde d'azote	NO_2^{\bullet}	Acide nitreux	HNO_2
Oxyde nitrique	NO^{\bullet}	Chlorure de nitrile	NO_2Cl
Cation nitrosyle	NO^+	Anion nitrosyle	NO^-
Radical thiyl	RS^{\bullet}	Acide peroxynitrique	$ONOOH$
Radicale protéine	P^{\bullet}	Oxyde nitreux	N_2O

Réalisé à partir des données de Gülçin (2012)

Produites en concentrations basales, ces espèces réactives participent à des fonctions physiologiques telles que la défense contre les microorganismes, la fécondation ou le maintien du tonus vasculaire. Cette quantité physiologique peut s'accroître rapidement du fait de l'influence de facteurs externes, incluant l'exposition aux radiations (UV solaire, rayon X) ou à certains solvants et pesticides, les polluants, la fumée de cigarette, etc. ...

Formées en trop grande quantité, les espèces réactives deviennent délétères pour l'organisme. Leur nature instable les rend très réactives vis-à-vis de substrats biologiques majeurs tels que des acides nucléiques, des lipides, les protéines, les acides gras polyinsaturés et des glucides, induisant ainsi des modifications potentiellement impliquées dans l'apparition de nombreuses pathologies (Haleng, Pincemail, Defraigne, Charlier et Chapelle, 2007; Nkhili, 2009). Longtemps considérées comme des agents toxiques responsables de dysfonctionnements, il est actuellement admis que ces espèces réactives sont de véritables messagers secondaires impliqués aussi bien dans l'expression et la régulation des fonctions prolifératives que dans la mort cellulaire (**Figure 1.39**) (Dröge, 2002; Nathan et Cunningham-Bussel, 2013).



Adapté de Nathan et Cunningham-Bussel (2013) avec permissions de l'éditeur

L'activation du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) déclenche la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Ceci augmente la phosphorylation (P) de l'inhibiteur de NF-κB (IκB). Le facteur nucléaire κB (NF-κB) est ensuite libéré et rejoint le noyau pour initier la transcription. Sous hypoxie, une augmentation de la production de ROS conduit à l'accumulation de HIF1α régulant l'expression de gènes. La production de ROS par la NADPH oxydase (NOX) suite à l'activation du récepteur favorise la phosphorylation des tyrosines kinases (TK) et la transduction du signal subséquente.

Figure 1.39 : Exemples de régulation de la transcription médiée par les ROS

2. Systèmes antioxydants

En fonction de la discipline scientifique, la définition d'un antioxydant peut varier considérablement. Mais en résumé, il s'agit d'une entité capable de prévenir, réduire, ou arrêter un processus oxydatif, lorsqu'elle est utilisée à des concentrations très modestes comparativement au système oxydable (Amorati, Foti et Valgimigli, 2013).

2.1 Nature des antioxydants

Les antioxydants sont de natures diverses et plusieurs classifications sont proposées dans la littérature. En fonction de leurs origines, on peut distinguer des antioxydants endogènes et des antioxydants exogènes.

2.1.1 Antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes et antioxydants non enzymatiques produits par l'organisme pour lutter contre l'excès d'espèces réactives (Bouguerne, 2012; Haleng et al., 2007). Au niveau enzymatique, il s'agit essentiellement de la :

- Superoxyde dismutase (SOD), une métalloprotéine capable d'éliminer de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$.
- Catalase, enzyme intracellulaire des peroxysomes qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène.

- Glutathion peroxydase (GPxs), une enzyme selenium (Se)-dépendante, capable d'éliminer les peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) et les peroxydes lipidiques résultant de l'action des espèces réactives sur les acides gras polyinsaturés.

D'autres enzymes, telles que l'hème oxygénase et les thiorédoxines / thiorédoxines réductases sont également décrites dans la littérature.

En ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques, ce sont :

- des protéines-thiols sous forme réduite telle que le glutathion (GSH) qui en plus d'être un cofacteur de la GPx, arrive à chélater des métaux de transition et régénérer les vitamines E et C à partir de leur formes radicalaires.
- et des protéines de stockage des métaux de transitions comme la transferrine, qui diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant, avec pour conséquence la réduction de réaction de Fenton génératrice d'espèces réactives.

2.1.2 *Antioxydants exogènes*

L'intérêt des antioxydants exogènes réside dans leur capacité à atténuer le stress oxydant. On distingue des antioxydants d'origine naturelle et des antioxydants de synthèse.

2.1.2.1 Les antioxydants naturels

En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ils peuvent être classés en deux groupes (Balasaheb Nimse et Pal, 2015; Podsędek, 2007).

➤ *Les antioxydants naturels hydrosolubles*

L'acide ascorbique (vitamine C), est considéré comme l'un des plus puissants antioxydants naturels de faible toxicité. On le retrouve en concentrations élevées dans de nombreux aliments, en particulier les fruits (agrumes, kiwi, cerises, melons) et des légumes (tomates, brocoli, chou-fleur).

Les composés phénoliques constituent également un vaste groupe d'antioxydants naturels ubiquitaires des plus importants. Des flavonoïdes et des acides phénols ont été identifiés dans diverses espèces de plantes, et dans toutes les parties (feuilles, tiges, racines, fruits, graines...).

➤ *Les antioxydants naturels liposolubles*

Les tocophérols dont fait partie la vitamine E (α - tocophérol), sont des antioxydants liposolubles très connus et largement utilisés. En général, les huiles végétales, les noix et les graines présentent les concentrations les plus élevées en vitamine E (Kamal-Eldin et Budilarto, 2015).

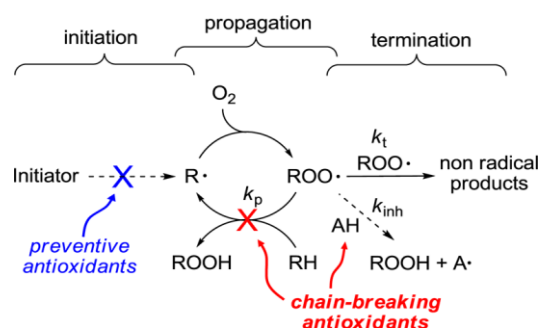
Les caroténoïdes à l'instar du β -carotène, du lycopène, de la lutéine et des xanthines sont des pigments naturels dotés d'une activité antioxydante majeure. Ils sont responsables de la coloration orange et rouge de nombreux fruit et légumes (Rodriguez-Amaya, 2015).

2.1.2.2 Les antioxydants de synthèse

Il existe également des antioxydants synthétiques souvent dérivés des antioxydants naturels. Ces synthèses ont pour objectif de renforcer l'activité antioxydante et la biodisponibilité de ces produits tout en réduisant le coût de leur production comparativement aux molécules naturelles. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés pour des applications pharmacologiques ou agroalimentaires sont le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, le tert-butylhydroquinone et le gallate de propyle. Cependant, l'utilisation de certains antioxydants de synthèse tend à être limitée de nos jours du fait d'une suspicion de toxicité (Makahleh, Saad et Bari, 2015). D'autres composés tels que le Trolox[®] (dérivé hydrosoluble de la vitamine E), le BDMC et DMC (Analogue synthétique de la curcumine) sont également décrits dans la littérature (Bouguerne, 2012; Gülçin, 2012).

2.2 Mécanismes d'action antioxydante

Les grandes étapes du processus général de l'oxydation à savoir l'initiation, propagation et terminaison (Figure 1.40), ont permis de cerner les mécanismes mis en jeu par certains antioxydants.



Adaptée d'Amorati, Foti, et Valgimigli (2013) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.40: Les étapes du processus général de l'oxydation

2.2.1 L'activité antioxydante directe

Les composés capables d'interférer directement avec les différentes étapes de la chaîne de réactions sont dotés d'une activité antioxydante directe. Cette activité antioxydante directe peut être à titre préventif ou piéger directement les espèces réactives (activité antiradicalaire).

2.2.1.1 Activité antioxydante préventive

Elle vise à limiter la production d'espèces réactives en interférant avec le processus d'initiation. Autrement dit, la formation initiale de radicaux est retardée.

➤ Inhibition enzymatique

Les propriétés antioxydantes de certains composés sont dues à leur capacité à inhiber des enzymes directement liées à la formation des radicaux libres. Ces composés sont souvent de natures diverses pour une

enzyme donnée et les interactions conduisant à l'inhibition ne sont pas toujours élucidées. Par exemple la lipooxygénase est responsable de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Il a été démontré que des flavonoïdes tel que la quercétine ont la capacité de former une liaison covalente avec l'enzyme, la rendant inactive (Redrejo-Rodriguez, Tejeda-Cano, del Carmen Pinto et Macías, 2004; Sadik, Sies et Schewe, 2003). Aussi, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique impliqué dans la production de peroxydes. Certains auteurs suggèrent que, comme l'apocynine (inhibiteur sélectif de la NADPH oxydase), certains composés phénoliques peuvent désorganiser des sous-unités du complexe enzymatique conduisant ainsi à une activité antioxydante et anti-inflammatoire (**Figure 1.41**) (Premysl Mladenka, Zatloukalová, Filipský et Hrdina, 2010).



Adaptée de Mladenka et al. (2010) avec permissions de l'éditeur

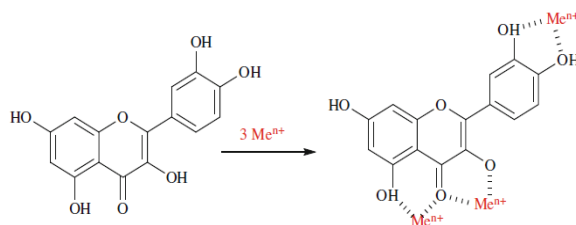
Figure 1.41: Éléments de structure potentialisant l'inhibition de la NADPH oxydase

➤ Chélation de métaux de transition

Les ions métalliques présents dans l'organisme (fer, cuivre) peuvent contribuer à la production d'espèces très réactives à partir de l'espèce moins réactive H_2O_2 via la réaction de Fenton:



Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, du fait de leur capacité à chélater des métaux peuvent limiter des réactions oxydatives de Fenton (**Figure 1.42**) (Balasaheb Nimse et Pal, 2015).



Adaptée de Gülçin (2012) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.42: Propriétés chélatantes des polyphénols

2.2.1.2 Activité antiradicalaire

Cette activité traduit la capacité de composés antioxydants à empêcher l'action d'un radical libre sur une cible, en les piégeant directement ou en protégeant la cible par des phénomènes de transfert d'électron ou d'hydrogène (Anouar, 2011; Craft, Kerrihard, Amarowicz et Pegg, 2012; Gülçin, 2012).

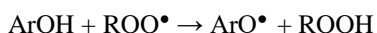
- le transfert d'hydrogène (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*): $ArOH + R^\bullet \rightarrow ArO^\bullet + RH$
- le transfert d'électron (SET, *Single Electron Transfer*): $ArOH + R^\bullet \rightarrow ArOH^{+\bullet} + R^-$

Par contre, ces composés sont des antiradicalaires efficaces que s'ils :

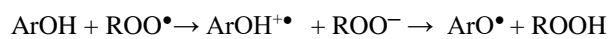
- (i) piègent des radicaux libres impliqués dans un processus d'oxydation en chaîne
- (ii) réagissent beaucoup plus rapidement que la cible à protéger (notion de cinétique)
- (iii) forment des espèces qui ne participent pas au processus d'oxydation en chaîne.

De nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes d'action antiradicalaire des composés naturels. En ce qui concerne les polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, leur faible potentiel redox les rend thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux. Selon le milieu réactionnel, les mécanismes mis en jeu sont: (Anouar, 2011; Craft et al., 2012; Gülçin, 2012)

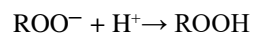
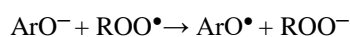
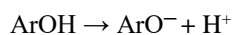
- Transfert de proton couplé à celui d'électron (PC-ET, *Proton Coupled-Electron Transfer*) :



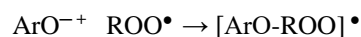
- Transfert d'électron suivi de celui de proton (SET-PT, *Electron transfer-Proton transfer*) :



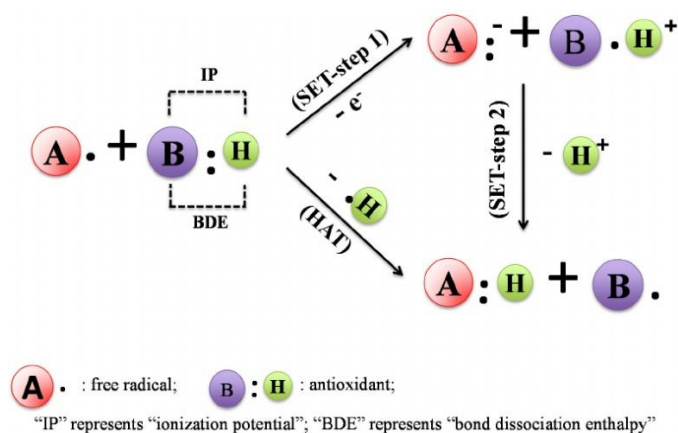
- Transfert de proton suivi de celui d'électron (SPLET, *Sequential Proton Loss Electron Transfer*) :



- Formation d'adduit :



On notera également que l'énergie de dissociation et le potentiel d'ionisation d'une fonction phénolique (**Figure 1.43**) constituent deux paramètres physicochimiques d'intérêt majeur. Respectivement prédictives de la capacité à transférer un atome d'hydrogène ou un électron, ces constantes permettent d'obtenir des indications fiables concernant l'efficacité et le mécanisme d'un antioxydant (Quideau et al., 2011).



Adaptée de Liang et Kitts (2014) Miguel-Chávez (2017) ©

Figure 1.43 : Les paramètres Influencant la réactivité des antioxydants.

Cependant, au-delà de ces propriétés antioxydantes présentées, il est également admis actuellement que dans certaines circonstances (concentrations, paramètres physiques du milieu tel que le pH,...), les polyphénols peuvent agir comme des prooxydants. Par exemple, pour des composés ayant un grand nombre de groupe hydroxyle OH sur le cycle B, la chélation de métaux peut donner naissance à des réactions de Fenton qui engendrent des anions peroxydes O_2^{\bullet} . Aussi, l'instabilité du radical flavonoïde phenoxyyl formé ArO^{\bullet} peut-être à l'origine de réactions d'oxydation secondaires indésirables (Procházková, Boušová et Wilhelmová, 2011).

2.2.2 L'activité antioxydante indirecte

Il s'agit de mécanismes d'action antioxydants qui consistent essentiellement en une régulation de l'expression génique de certaines protéines (enzymes et effecteurs). Ces composés sont généralement à l'origine de l'activation ou de l'inhibition de facteurs de transcription (Nf-kB, Nrf-2, Keap1...) liés à l'expression d'antioxydants endogènes (SOD, GPx, catalase, glutathion réductase) ou à l'expression d'enzyme à l'origine de la production de radicaux libres (NADPH oxydase, xanthine oxydase, lipooxygénase, •NO Synthase ...).

Du fait du manque de spécificité, ce type de mécanisme d'action antioxydant est très souvent associé à des propriétés anti-inflammatoires ou apoptotiques (Amorati et al., 2013).

3. Test d'activité antioxydante in vitro

De très nombreuses méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant de substances d'origine naturelle ont été développées. Même si elles présentent de nombreuses insuffisances, les méthodes *in vitro* restent un choix de prédilection. Parmi ces méthodes *in vitro*, les tests chimiques, faciles à mettre en place et relativement peu onéreuses, sont des outils majoritairement employés. (Alam, Bristi et Rafiquzzaman, 2013).

Dans la littérature scientifique, on retrouve de multiples classifications pour ces tests d'exploration de l'activité antioxydante. Parmi ces tests, les mécanismes antiradicalaires sont de loin, ceux qui suscitent le plus d'intérêt, justifiant ainsi l'utilisation récurrente de ce type de méthode dans le screening des molécules naturelles (Zhong et Shahidi, 2015).

3.1 Les tests anti-radicalaires classiques

3.1.1 Tests chimiques

Les réactions chimiques impliquées dans ces types de tests peuvent être divisées en trois catégories: (1) les analyses basées sur des réactions de transfert d'électron unique (SET), (2) les essais basés sur les transferts d'atome d'hydrogène (HAT) et (3) un troisième groupe se composant de tests de capacité antioxydante qui impliquent à la fois SET (et HAT). Même si le résultat final est le même quel que soit le mécanisme mis en jeu, la cinétique et la probabilité de réactions secondaires sont souvent très différentes. Les mécanismes de SET et HAT se produisent presque toujours dans un même échantillon en fonction de la structure des composés présents et du pH. Le **tableau 1.9** résume les avantages et les limites de tests très populaires dans la

détermination de capacités antioxydantes (Apak, Özyürek, Güçlü et Çapanoğlu, 2016; Huang, Ou et Prior, 2005; Ndhkala, Moyo et Van Staden, 2010).

Tableau 1.9 : Avantages et limites rapportés pour certains tests chimiques

Méthodes	Mécanismes	Avantages	Limites
Test au DPPH•	Transfert d'électron et Transfert d'hydrogène	Rapide, simple, peu coûteux, largement utilisé	Solvant dépendant
Test ORAC	Transfert d'hydrogène	Reproductibilité inter-laboratoire	Sensible au pH Matériel plus coûteux Temps d'analyse
Test TEAC	Transfert d'électron et Transfert d'hydrogène	Très rapide, indépendant du pH et du solvant, évalue en même temps les composés hydrophiles et lipophiles	peu reproductible, inadapté pour des composés de faible réactivité, peu de corrélation avec les effets biologiques
Test FRAP	Transfert d'électron	Rapide, simple, peu coûteux	Condition non physiologique, n'intègre pas les composés lipophiles.
Test CUPRAC		Condition physiologique, Possible pour les composés lipophiles et hydrophiles.	Hydrolyse des hétérosides est souvent nécessaire

Réalisé à partir des données de Carreras Cardona (2012)

3.1.1.1 Les Tests de transfert d'électron

Les tests de type SET impliquent un système redox (réactions d'oxydoréduction) entre une substance oxydante (radical jouant le rôle de la sonde colorée) et un antioxydant (l'essai à tester) qui est réducteur. L'oxydant est donc la cible utilisée pour le suivi d'un tel test car l'intensité de sa décoloration servira à exprimer la capacité antioxydante de l'essai introduit. Ce type de test détermine donc la capacité d'un essai à réduire des composés, y compris les métaux, les carbonyles et les radicaux libres (Huang et al., 2005; Ndhkala et al., 2010).

Les principaux tests décrits dans la littérature sont le FRAP (*ferric reducing antioxydant power*) et le CUPRAC (*Cupric ion-Reducing Antioxydant Capacity*) (López-Alarcón et Denicola, 2013; Özyürek, Güçlü et Apak, 2011).

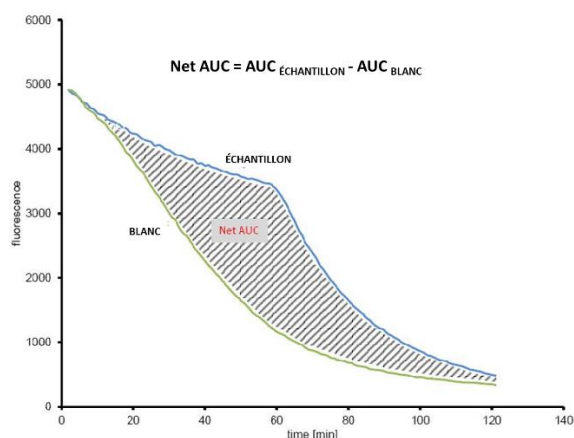
3.1.1.2 Les Tests de transfert d'hydrogène (HAT)

Les essais basés sur les mécanismes de type HAT mesurent une cinétique compétitive dans un milieu réactionnel composé de 3 éléments : un générateur de radicaux synthétique, d'une sonde moléculaire oxydable (fluorescéine, luminol, β -carotène, Crocine) et un composé antioxydant (essai à tester) (Huang et al., 2005; Ndhkala et al., 2010).

Ces méthodes évaluent la capacité de certaines molécules à inhiber l'oxydation d'une molécule cible par un radical peroxyde. L'AAPH (*2,2'-azobis (2-methylpropionamide)-hydrochloride*) est fréquemment utilisé comme source de radical peroxyde. L'oxydation de la sonde par l'AAPH est habituellement suivie par spectrophotométrie UV-visible ou par fluorimétrie : la consommation de la molécule cible par le radical peroxyde entraîne une diminution de l'absorption ou de la fluorescence. Ainsi, l'incubation de la molécule cible,

de l'AAPH et d'un antioxydant conduit à une inhibition de la consommation de la molécule cible (López-Alarcón et Denicola, 2013).

Ce type de mécanisme est important pour les composés impliqués dans la rupture de chaîne d'oxydation. Les tests impliquant des HAT tiennent donc compte de la cinétique, donc de l'activité antioxydante en plus de la capacité antioxydante. Les principaux tests n'utilisant qu'un transfert d'hydrogène sont l'ORAC (*oxygen radical assay capacity*) et TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*). L'ORAC détermine l'activité antioxydante d'échantillon en mesurant l'aire sous la courbe de la cinétique de consommation de la molécule cible (**Figure 1.44**).



Adapté de Czaplicki (2013)

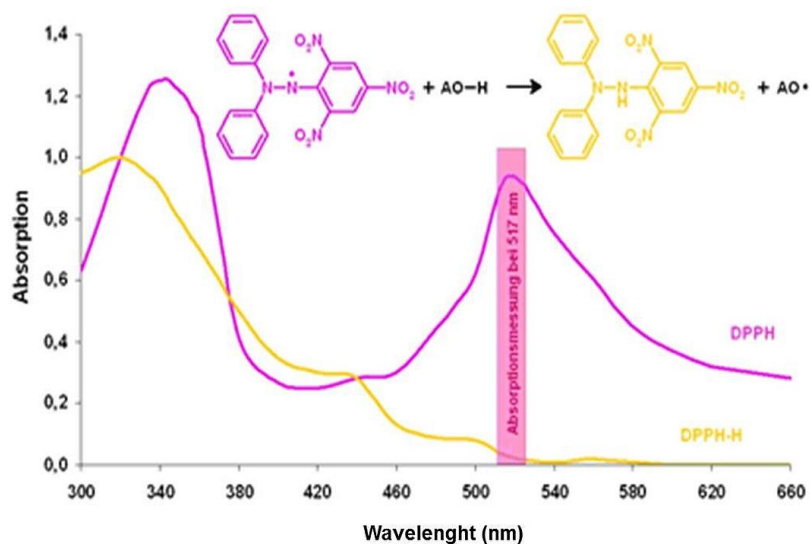
Figure 1.44 : Principe du test ORAC.

Cette activité est comparée à celle du Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E (López-Alarcón et Denicola, 2013). Des variantes de la méthode ORAC existent également pour l'évaluation des antioxydants lipophiles (Huang et al., 2005; Ndhala et al., 2010).

3.1.1.3 Les Tests mixtes de transfert d'hydrogène et d'électron

Les travaux de Litwinienko et Ingold (2005; 2003) ont montré que la nature des solvants utilisés avait une influence sur la cinétique et sur les mécanismes antiradicalaires mis en jeu. Ainsi pour certains tests la nature aprotique polaire (ACN, DMSO), protique polaire (EtOH, MeOH) et apolaire peut favoriser un mécanisme de transfert au détriment d'un autre. Prior, Wu, et Schaich (2005) considèrent que le test de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdène), le test au DPPH, et le test TEAC (ABTS) sont des tests basés sur des phénomènes mixtes de SET et HAT, avec cependant une prédominance dans les transferts d'électrons.

Le DPPH• (*2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl*) est commercialisé sous sa forme radicalaire, soluble seulement dans les solvants organiques (méthanol, éthanol). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, le DPPH• reste dans sa forme monomère, relativement stable en solution (Popovici, Saykova et Tylkowski, 2010). L'efficacité d'un antioxydant s'évalue en mesurant par spectrophotométrie la diminution de la coloration violette (**Figure 1.45**) après 30 min.



Adapté de Pérez et al. (2013)

Les résultats du test au DPPH sont exprimés en % d'inhibition (% RSA : Radical Scavenger Activity), en EC_{50} (Efficient Concentration) ou AE (Antiradical Efficiency) avec :

$$\% \text{ RSA} = [(DO \text{ contrôle} - DO \text{ Essai}) / DO \text{ contrôle}] \times 100\%$$

CE_{50} = la concentration en antioxydant qui piège 50% de DPPH.

$AE = 1 / (CE_{50} \times T_{CE_{50}})$ ou $T_{CE_{50}}$ représente le temps correspondant à CE_{50}

Figure 1.45: Principe du test au DPPH

3.1.1.4 Autres tests antiradicalaires

Les radicaux libres utilisés pour les tests précédemment évoqués ont des structures complètement différentes de ceux rencontrés *in vivo*. Certains auteurs proposent donc des tests antiradicalaires utilisant des espèces réactives telles que le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), des radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxyde nitrique ($^{\bullet}NO$) que l'on est plus susceptible de rencontrer au niveau cellulaire (Huang et al., 2005). Ces espèces chimiques sont utilisées aussi bien lors de tests purement chimiques ou dans des modèles cellulaires *in vitro*.

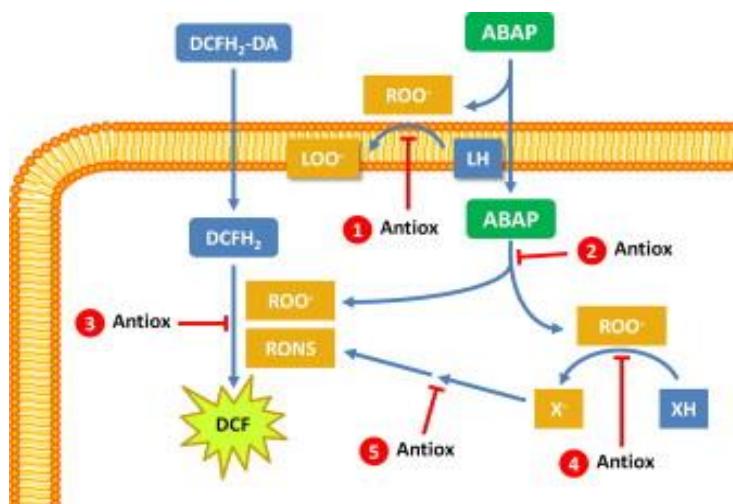
3.1.2 Tests biologiques

Pour étudier l'aptitude des molécules naturelles à protéger des organismes contre des radicaux libres, la seule utilisation des tests chimiques s'avère insuffisante car ils ne prennent pas en compte les paramètres biologiques. La capacité des molécules naturelles doit également être évaluée au niveau cellulaire afin de mieux intégrer les mécanismes d'action sur le vivant (López-Alarcón et Denicola 2013).

Le coût des essais est malheureusement très souvent conséquent du fait de la nécessité de modèles cellulaires spécifiques. Néanmoins, ces tests s'avèrent indispensables et complètent les tests chimiques. L'évaluation du potentiel antioxydant *in vitro* sur des cellules constitue une alternative aux tests sur les animaux ou sur l'homme, qui coûteraient encore plus cher et dont l'exploitation des résultats prendrait plus de temps.

Wolfe et Liu (2007) ont développé un test de détermination de l'activité antioxydante cellulaire (CCA, *Cellular Capacity Antioxydant* ou *intracellular ROS Scavenging*).

C'est la forme ester 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) qui permet le passage transmembranaire de DCFH₂, libéré grâce aux estérases intracellulaires. L'AAPH en contact avec la membrane lipidique génère un flux de radicaux libres intracellulaire qui vont oxyder DCFH₂ en DCF, entraînant une diminution de fluorescence (**Figure 1.46**). Il a été mis en évidence qu'un antioxydant exposé au modèle décrit est capable de protéger l'oxydation intracellulaire de DCFH₂. Cette méthode, semblable à celle de l'ORAC, mesure par fluorimétrie la capacité des composés à prévenir l'oxydation intracellulaire de DCFH₂ (Wolfe et Liu, 2007).



Adapté de López-Alarcón et Denicola (2013) avec permissions de l'éditeur.

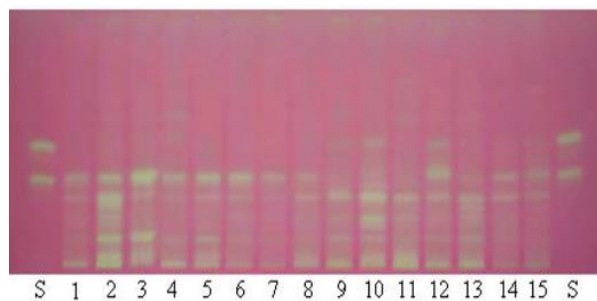
Figure 1.46: Principe du test de l'activité antioxydante cellulaire

3.2 Les tests associant des techniques séparatives

Des méthodes couplant des séparations chromatographiques à certains des tests précédemment décrits ont récemment été développées. Particulièrement précieuses, elles permettent une détection directe des métabolites actifs d'un mélange complexe.

3.2.1 La bioautographie

Cette méthode consiste en une analyse sur chromatographie sur couche mince, classique ou haute performance, suivie d'une dérivation utilisant une solution colorée de radicaux libres comme le DPPH•.



Adapté de Wang et al. (2012)

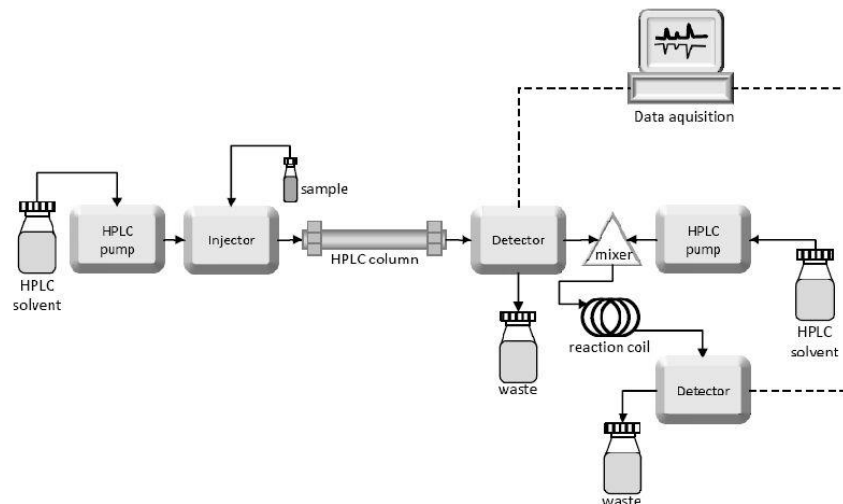
Figure 1.47: Résultat d'un test de bioautographie par le DPPH•.)

Les composés d'intérêts présentant une activité antiradicalaire décolorent le DPPH• (**Figure 1.47**) (Meriane, Genta-Jouve, Kaabeche, Michel et Boutefnouchet, 2014; J. Wang et al., 2012).

3.2.2 HPLC - DPPH•

Deux techniques de couplage en HPLC sont décrites dans la littérature. Il s'agit de :

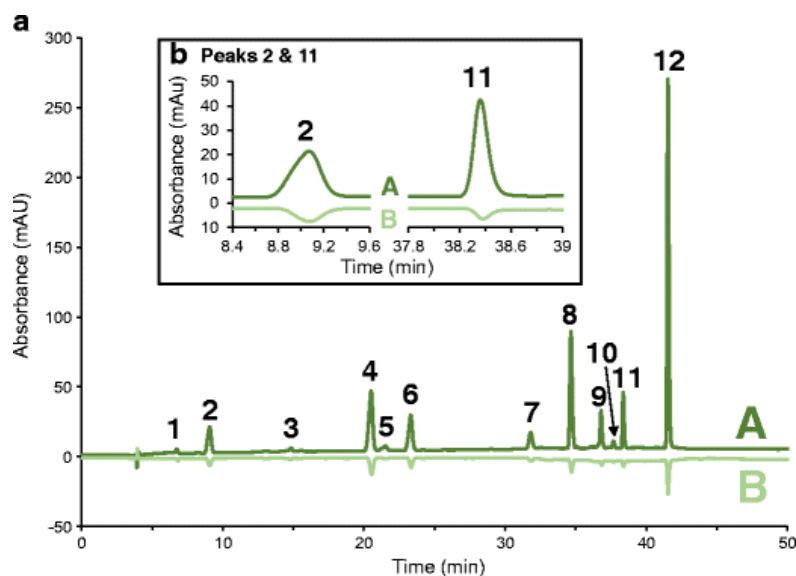
- L'HPLC - DPPH• post-colonne ou « on-line » qui impliquent le couple en continu à la sortie de colonne, d'un réactif. Ce dernier consiste généralement en une solution de radical coloré (DPPH• ou ABTS⁺) qui réagit avec les composés séparés dans une chambre de mélange. La détection se fait ensuite au maximum d'absorption du radical et toute baisse d'intensité peut être associée à un métabolite actif (**Figure 1.48**).



Adapté de Czaplicki (2013)

Figure 1.48: Dispositif expérimental pour l'analyse On line HPLD – DPPH

- L'HPLC - DPPH• pré-colonne ou l'échantillon à analyser est mis en solution avec une espèce radicalaire avant l'injection. Les métabolites réagissant avec le radical se distinguent alors par une baisse de l'intensité de leurs signaux (**Figure 1.49**). Cette approche serait moins contraignante en termes d'appareillage (Shi et al., 2012) .



Adapté de Geoffroy, Meda, et Stevanovic (2017) avec permissions de l'éditeur.

(A) avant la réaction avec DPPH radical libre, (B) après réaction avec les radicaux libres DPPH*

Figure 1.49: Réactivité de galloannins d'érable rouge observée à 280 nm.

En résumé, une pléthore de tests existe pour explorer la capacité antioxydante des molécules naturelles. La nature *in vitro* des tests que nous avons décrits ne devrait pas compromettre leur valeur. Bien au contraire, un test *in vitro* valable est un outil précieux pour les études *in vivo* si elle est combinée avec les données de biodisponibilité et des dosages valides pour les biomarqueurs du stress oxydant. Aussi il est important de souligner que les tests les plus couramment utilisés ne sont pas nécessairement les meilleurs, les plus faciles, les plus pertinents ou les plus précis. Plusieurs critères demeurent ainsi primordiaux dans le choix d'une méthode sa simplicité, le temps nécessaire, l'instrumentation, la reproductible, le cout, l'adaptabilité à un screening à haut débit (*High-throughput screening* HTS) et surtout le caractère prédictif de l'activité antioxydante *in vivo* (Pinchuk, Shoval, Dotan et Lichtenberg, 2012).

Enfin, notons que du fait de la diversité des mécanismes d'action, l'activité antioxydante ou la capacité antioxydante d'un échantillon ne devrait être conclue sur la base d'un modèle unique de test. En pratique, plusieurs procédures d'essai *in vitro* doivent être envisagées pour une étude.

4. Le stress oxydant, l'inflammation et les maladies chroniques

Dans les conditions physiologiques, la production des radicaux libres (ROS) est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme. La balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Le stress oxydant se définit comme un état de déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes. Il peut être d'origine accidentelle comme un état d'inflammation, une exposition à des radiations ou à des xénobiotiques prooxydants. Il peut être aussi d'origine génétique comme un déficit dans l'expression d'enzymes de défense antioxydantes.

Ce déséquilibre a pour conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Fiorucci, 2006).

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, tandis que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. Les progrès réalisés dans la recherche depuis ces deux décennies ont permis de comprendre le mécanisme par lequel le stress oxydant peut conduire à une inflammation chronique qui à la longue favorise l'émergence de maladies chroniques (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, neurologiques, articulaires et pulmonaires) (Reuter, Gupta, Chaturvedi et Aggarwal, 2010)

La majeure partie des effets biologiques des ROS passe par l'installation d'un processus inflammatoire qui, lorsqu'il est chronique, entretient l'état de stress oxydant. Le stress oxydant apparaît donc comme un facteur déclenchant ou associé aux complications de ces maladies apparaissant avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres (Kaushal, 2012; Narasimhulu, Jiang, Yang, Selvarajan et Parthasarathy, 2012) .

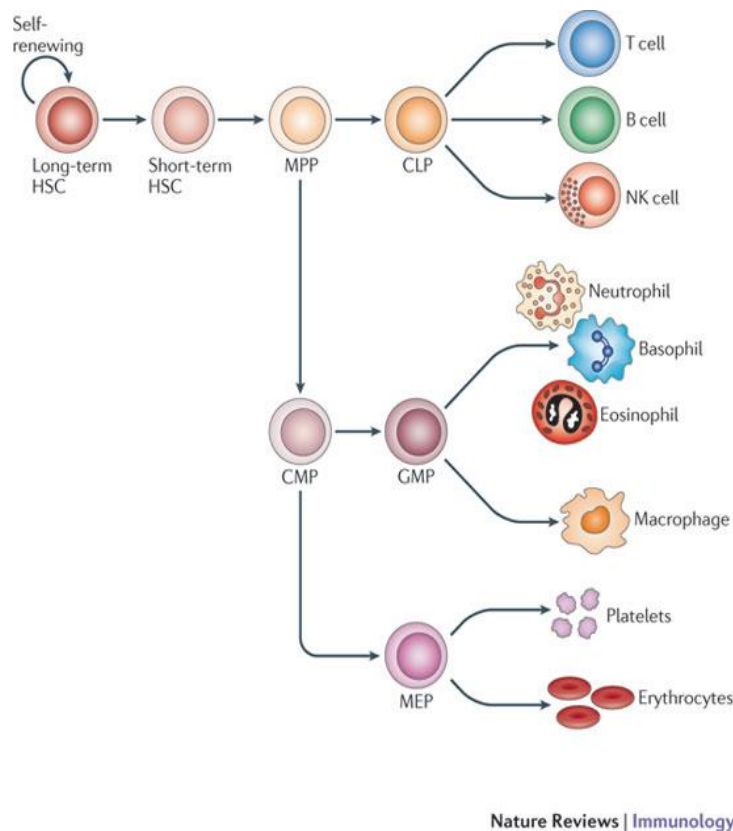
CHAPITRE 4 : NEUTROPHILES ET RÉPONSES INFLAMMATOIRES

1. Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire regroupe un ensemble d'organes, de cellules et de médiateurs qui ont pour mission de défendre l'organisme contre les stimuli néfastes d'origine externe (agents pathogènes) ou interne (cellules endommagées ou cancéreuses). La réaction de l'organisme en réponse à ces stimuli est la réaction inflammatoire. Il s'agit d'une réponse biologique complexe impliquant les acteurs du système immunitaire, qui, en collaborant, ont pour but de proscrire le stimulus initial et réparer les tissus endommagés (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; Owen, Punt, Stranford et Company, 2014).

1.1 Les différents acteurs du système immunitaire

1.1.1 Les cellules



Adaptée King et Goodell (2011) avec permissions de l'éditeur

Haematopoietic stem cells (HSCs), multipotent progenitors (MPPs), common lymphoid progenitor (CLP), common myeloid progenitor (CMP), granulocyte and macrophage progenitor (GMP), megakaryocyte and erythrocyte progenitor (MEP), natural killer (NK).

Figure 1.50: Le diagramme de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus au cours duquel les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules sanguines matures. Les cellules du système immunitaire sont issues de deux lignées de cellules sanguines que sont, les lignées myéloïde et lymphoïde. Les hématies et de plaquettes complètent ainsi le diagramme de l'hématopoïèse (**Figure 1.50**) qui se déroule dans les organes lymphoïdes primaires. Les cellules immunitaires sont disséminées dans tout l'organisme à travers le sang et la lymphe, ce qui leur permet d'être disponibles en tout temps et lieu lorsque qu'un besoin se fait sentir (Genetet, 2002).

En fonction de leur apparence au microscope et/ou de leur fonction, les cellules du système immunitaire peuvent être regroupées en trois (3) sous-populations : les granulocytes, les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules de la lignée lymphocytaire (Owen et al., 2014). Quelques caractéristiques de ces cellules sont présentées dans le **tableau 1.10**.

Tableau 1.10 : Caractéristiques des cellules de l'immunité

Types cellulaires	Proportions	Caractéristiques / Fonctions
Neutrophiles	50-70 %	7 à 10h dans le sang circulant, augmentent dans le sang lors d'une infection, fonction majeure de phagocytose, sécrétion de cytokines
Éosinophile	1-3 %	Fonction de phagocytose et antiparasitaire (pluricellulaires et vers) Rôle dans l'asthme et l'allergie
Basophiles	< 1 %	Rares dans la circulation sanguine, libèrent de l'histamine, cellules non phagocytaires –Antiparasitaires (vers), sécrétion de cytokines
Mastocytes	-	Présence dans divers tissus avec des granules à histamine Rôle majeur dans l'allergie
Monocytes	1-6 %	Cellules non différenciées, Différentiation en macrophages / cellules dendritiques
Macrophages	-	Résidents tissulaires (Ostéoclaste, cellules microgliales, macrophages alvéolaires), Réponse immunitaire innée, Phagocytose – opsonisation, CPA (Phagocytose)
Cellules dendritiques	-	Longues extensions membranaires (surfaces de contact), Forme immature : fonction de surveillance (hors des ganglions) CPA (Phagocytose, endocytose via un récepteur ou pinocytose) Migration dans organes lymphoïdes pour activer lymphocytes T
Lymphocytes T	20- 40 %	LT _C (Cytotoxique, CTL, CD8 ⁺ , CMH I), élimination de cellules LT _H (helper, CD4 ⁺ ,CMH II) sécrétion de cytokines T _{H1} réponse immunitaire contre pathogènes intracellulaire T _{H2} réponse immunitaire anti-helminthes T _{H17} réponse immunitaire contre bactéries extracellulaires T _{Reg} (Régulateur, CD25 ⁺), réponse anti-inflammatoire
Lymphocytes B et Plasmocytes		Reconnaissance des antigènes, capacité de CPA, expression d'immunoglobuline de surface (BCR), sécrétion des anticorps lorsque activés en plasmocytes
Natural Killer		Élimination des cellules anormales ne présentant pas de CMH I du soi (cellules infectées et cellules cancéreuses),

Réalisé à partir des données de Genetet 2002; Owen et al. 2014; Björnsdóttir 2015),

CPA (Cellules présentatrices d'antigènes), CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), CD (*cluster of Differentiation*), BCR (*B cell receptor*)

1.1.2 Les organes lymphoïdes

1.1.2.1 Les organes lymphoïdes primaires (centraux)

Les organes lymphoïdes primaires sont les lieux de développement et de maturation des cellules du système immunitaire à partir des précurseurs immatures. Il s'agit de la moelle osseuse et du thymus (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

1.1.2.2 Les organes lymphoïdes secondaires (périphériques)

C'est au niveau des organes lymphoïdes secondaires que les cellules de l'immunité rencontrent l'antigène et initient la réponse immunitaire. Ces organes sont répartis dans tout l'organisme. Ce sont les ganglions lymphatiques, la rate, et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) qui regroupent de multiples tissus du tractus gastro-intestinal, des voies respiratoires, les amygdales, les plaques de Peyer et de l'appendice. Les organes lymphoïdes secondaires sont connectés entre eux et aux autres tissus par l'intermédiaire du sang et de la lymphe (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

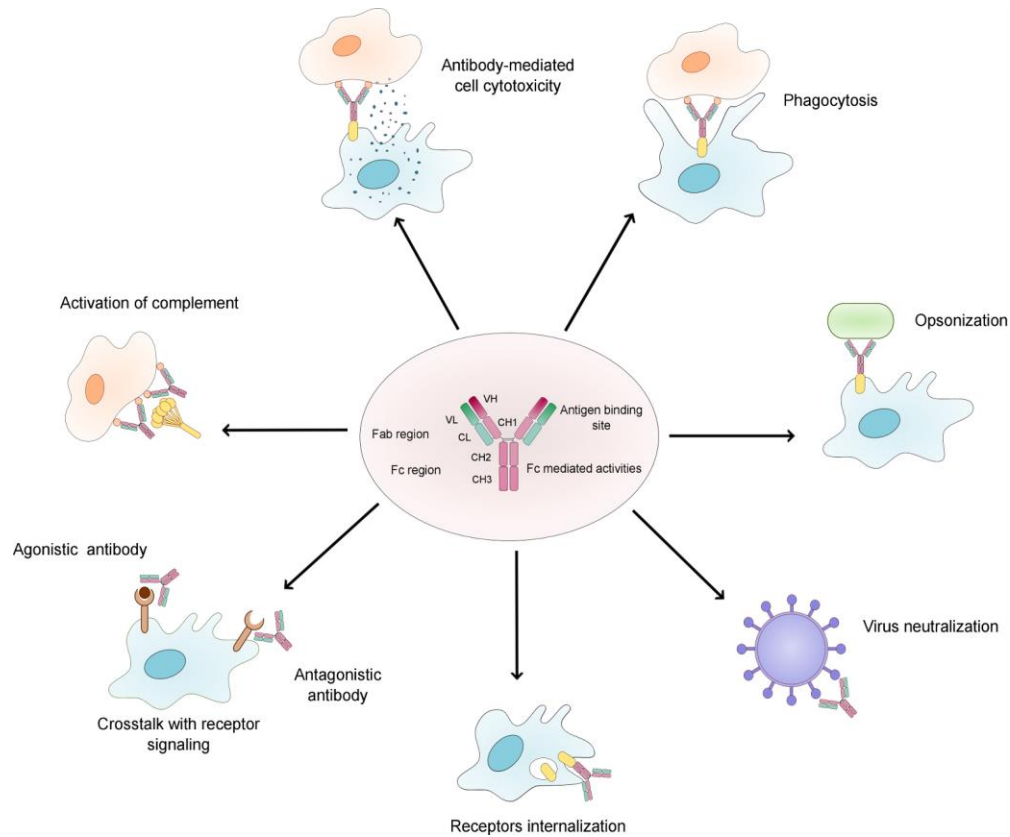
Le système lymphatique est un réseau de vaisseaux à paroi mince, rempli de liquide riche en protéines, la lymphe. La lymphe provient du plasma qui s'infiltré par les parois minces des capillaires dans le microenvironnement des tissus environnants. Ce liquide interstitiel peut atteindre 2,9 litres chez l'adulte. Le contenu du système lymphatique retourne *in fine* dans le sang pour assurer un certain état d'équilibre (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

1.1.3 Les médiateurs du système immunitaire

1.1.3.1 Les anticorps

Les anticorps font partie d'une grande famille de médiateurs de l'immunité impliquée pour la plupart dans des phénomènes de reconnaissance. Ils sont produits sous forme membranaire ou sécrétée par les lymphocytes B. Leur structure macromoléculaire complexe peut-être résumée à une structure de base comprenant quatre (4) chaînes polypeptidiques : 2 chaînes légères (L, *Light*) et deux chaînes lourdes (H, *Heavy*) reliées par des ponts disulfures. Les anticorps sont souvent représentés en Y avec deux régions identiques de liaison à l'antigène (région Fab) et une région effectrice (région Fc) qui peut activer le système du complément ou se fixer à des récepteurs spécifiques à la surface de certaines cellules immunitaires, dont les neutrophiles (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

Cinq (5) classes de chaîne lourde (γ : *Gamma*, μ : *mu*, δ : *delta*, ϵ : *epsilon* et α : *alpha*) servent à la classification des immunoglobulines. Ce sont donc respectivement les IgG, IgM, IgD, IgE et IgA qui assurent les différentes fonctions immunitaires de ces médiateurs de l'inflammation (**Figure 1.51**).



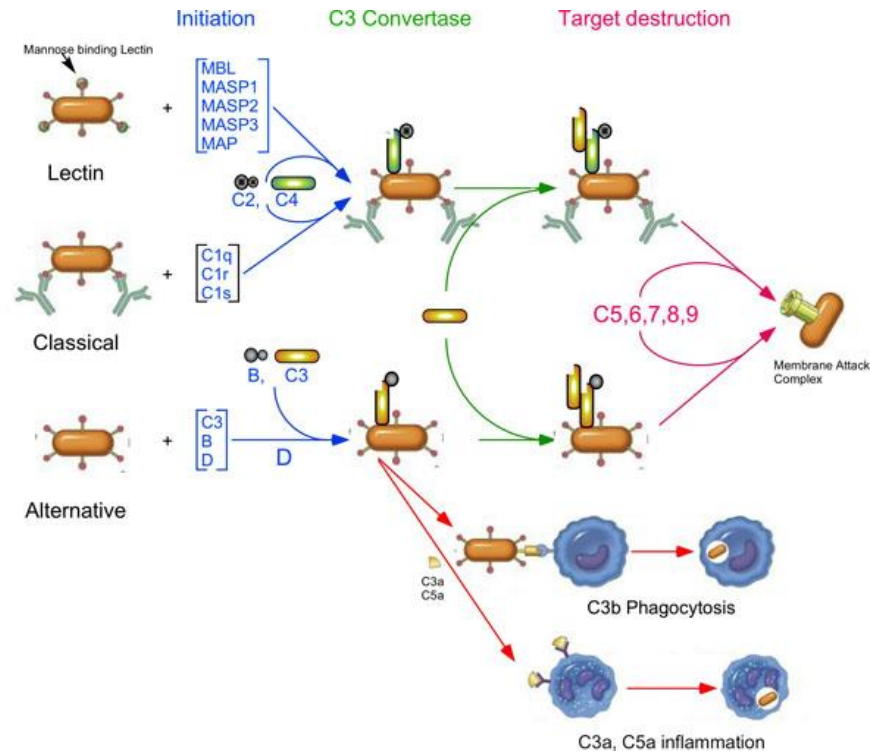
Adapté a de Spasevska (2014)

Figure 1.51: Les fonctions immunitaires des anticorps.

1.1.3.2 Le système du complément

Il s'agit d'un ensemble de protéines sériques intervenant dans l'élimination des agents pathogènes à travers l'immunité innée et adaptative. Plus d'une trentaine de protéines sont impliquées dans la cascade complexe du système du complément qui peut être activée selon 3 voies (la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne) (**Figure 1.52**).

La fonction principale du système du complément est d'augmenter la défense immunitaire contre les infections grâce aux propriétés d'opsonisation et de cytolysse de microbes. Ce système participe également à la réaction inflammatoire (chimiotactisme et activation de cellules immunitaires) et sert d'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; V. Kumar, Abbas et Aster, 2013; Owen et al., 2014).



Adaptée de Fritzinger et Benjamin (2016)

Les voies d'activation et quelques protéines impliquées dans la cascade du complément. L'ensemble de ces initiateurs (en bleu) concourent à l'activation de C3 (en vert). L'activation du complément assure de nombreuses fonctions immunitaires (en rose et rouge)

Figure 1.52 : Les voies d'activation et les fonctions effectrices du complément.

1.1.3.4 Les cytokines et les chimiokines

Les différents acteurs du système immunitaire étant dispersés partout dans le corps, l'efficacité de la réponse repose essentiellement sur la capacité de ses composantes à communiquer rapidement entre elles. Les molécules à la base de cette communication sont regroupées sous l'appellation « cytokine ». Le nom chimiokine est spécialement réservé à une sous-population de cytokine responsable de la migration des cellules immunitaires d'un point à un autre (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014).

Les cytokines sont des peptides glycosylés regroupés en 6 familles, chacune associée à un type de récepteur spécifique. Ainsi, l'interaction spécifique d'une cytokine avec son récepteur situé à la surface d'une cellule déclenche des voies de transduction pouvant conduire à des modifications majeures dans la cellule. Les cytokines régulent donc l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en réduisant les fonctions effectrices de ces cellules immunitaires (prolifération, différenciation, sécrétion d'anticorps et d'autres cytokines, mort cellulaire).

Bien qu'un grand nombre de cellules puissent assumer cette fonction de sécrétion de cytokines, les principaux producteurs sont les lymphocytes auxiliaires (Th), les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. La régulation de l'hématopoïèse, la réponse inflammatoire, les réponses immunitaires cellulaires

et humorales ainsi que la cicatrisation des plaies requièrent toutes l'implication de cytokines. (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014)

1.1.3.5 Médiateurs non protéiques

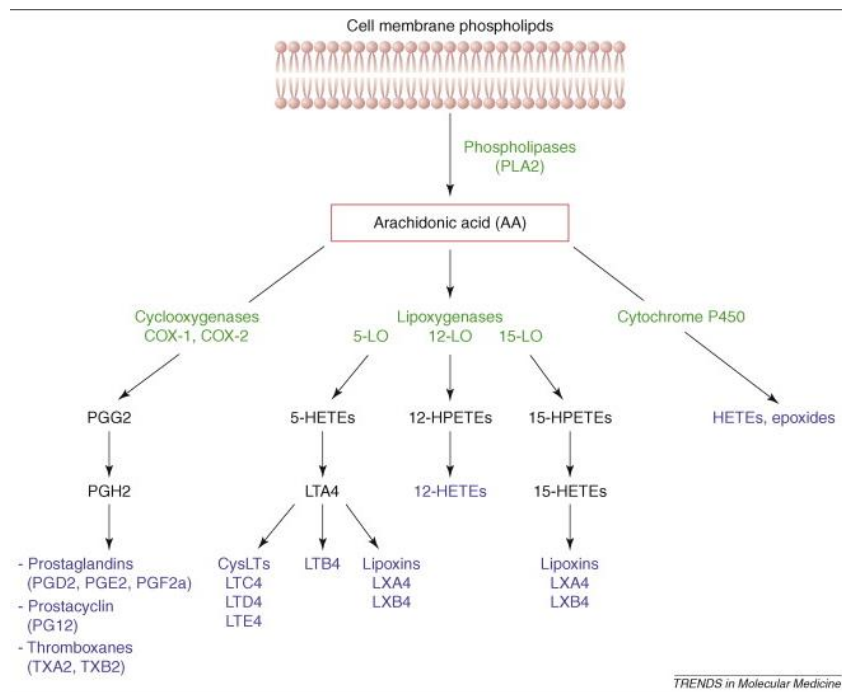
Les acteurs de la réponse immunitaire produisent souvent des médiateurs non protéiques que nous nous proposons de passer en revue dans cette partie.

➤ *Les amines vasoactives*

La sérotonine et l'histamine sont les amines vasoactives libérées dès les premiers instants de la réponse inflammatoire. L'histamine provient de la stimulation des mastocytes, des polynucléaires basophiles ou des plaquettes et augmente la perméabilité vasculaire. A l'inverse, l'agrégation plaquettaire et la coagulation provoque la libération de sérotonine qui induit une vasoconstriction. (V. Kumar et al., 2013)

➤ *Les métabolites de l'acide arachidonique*

Les leucocytes, les mastocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes sont des sources majeures d'acide arachidonique. Libéré sous l'action de phospholipases activées par divers stimuli, cet acide gras est le précurseur de deux voies métaboliques majeures : la voie des cyclooxygénases et celle de la 5-lipoxygénase. Les métabolites de ces voies (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes et leucotriènes), regroupés sous le nom d'eicosanoïdes interviennent dans la réponse immunitaire (**Figure 1.53**). (V. Kumar et al., 2013)



Adaptée de Harizi, Corcuff, et Gualde (2008) avec permissions de l'éditeur

Leucotriens (LTs), lipoxins (LXs), hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs)

Figure 1.53 : Les lipides bioactifs de la voie de l'acide arachidonique.

Les voies de métabolisation de l'acide arachidonique sont la cible de thérapies anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (comme l'aspirine).

➤ **Facteur d'activation plaquettaire (PAF)**

Également issus de l'action de phospholipases sur les phospholipides membranaires de neutrophiles, monocytes, plaquettes et cellules endothéliales, le facteur d'activation plaquettaire entraîne une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une bronchoconstriction. Il stimule également la production d'eicosanoïdes et de cytokines pro-inflammatoires. (V. Kumar et al., 2013)

➤ **Espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les espèces dérivées de l'oxygène sont produites par les neutrophiles et les macrophages activés via la NADPH oxydase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced*). Produit dans les lysosomes, ces espèces contribuent à la destruction des agents pathogènes et des cellules phagocytées. À faible dose, les ROS amplifient la réaction inflammatoire en modulant l'expression des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhésion cellulaire. Par contre, à fortes concentrations, ils entraînent des dommages cellulaires irréversibles. (V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014)

➤ **Le monoxyde d'azote •NO**

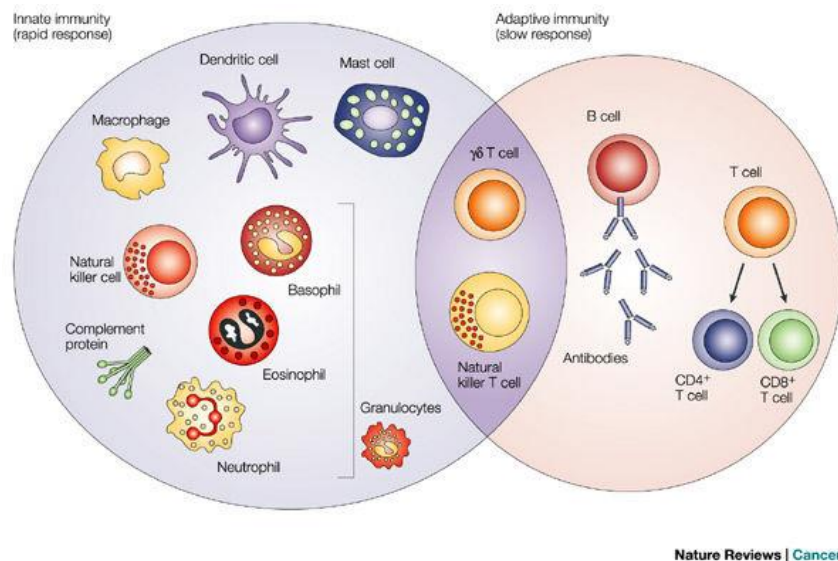
Le monoxyde d'azote est un radical produit par 3 isoformes de la •NO synthase (NOS) en fonction des organes. Par exemple, les neurones (nNOS) et les cellules endothéliales (eNOS) produisent du •NO qui participe à des fonctions physiologiques comme la régulation du flux sanguin. Par contre, une importante quantité de •NO issue de l'isoforme iNOS (NOS inducible), agit essentiellement au niveau des macrophages et de l'endothélium lors du processus inflammatoire. En plus de la fonction antimicrobienne dans les macrophages, ce •NO induit participe à la vasodilatation et à la réduction du recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation. (Owen et al., 2014)

En somme, l'ensemble de ces tissus, cellules et médiateurs qui constituent le système immunitaire participe à la surveillance, la détection et la mise en place de moyens de protection et de réponses adaptées à chaque situation.

1.2 Les réponses immunitaires

Le système immunitaire est souvent présenté comme la résultante de deux sous-ensembles qui coopèrent dans le but de protéger l'organisme des différentes agressions (**Figure 1.54**).

La première composante du système immunitaire appelée immunité innée regroupe un ensemble d'acteurs présents en tout temps. Ces acteurs, représentés essentiellement par les neutrophiles, défendent l'organisme dès les premières heures de l'agression. Cette réponse correspond à la réponse inflammatoire aiguë qui a pour but de circonscrire rapidement et neutraliser l'agression, tout en instaurant un processus de réparation. L'inflammation aiguë est donc un processus physiologique favorable pour l'organisme.



Adaptée de Dranoff (2004) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.54 : Nature des cellules impliquées en fonction de la réponse immunitaire.

Par contre, lorsque ce système de défense s'avère inefficace, l'organisme met en place un processus de défense spécifique pour éliminer les envahisseurs. Il s'agit de la réponse immunitaire adaptative ou spécifique qui fait intervenir d'autres types cellulaires comme les lymphocytes et les macrophages (**Figure 1.54**). Cette forme de réponse immunitaire est à la base du processus d'inflammation chronique qui accompagne la majeure partie des pathologies chroniques (cancer, maladies auto-immunes, hypersensibilité et rejet des greffes). L'inflammation chronique apparaît donc comme un processus délétère et aggravant de ces pathologies (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014).

1.2.1 Les mécanismes de la réaction inflammatoire aiguë

La réponse inflammatoire aiguë fait appel à de nombreux acteurs dont les cellules de l'immunité innée, les cellules hôtes du site de l'inflammation et de médiateurs.

1.2.1.1 Les barrières physiologiques

Les barrières physiologiques de protection constituent la première ligne de défense de l'organisme. Elles se composent de barrières physiques et chimiques. Les couches épithéliales (la peau et celles des muqueuses) qui isolent l'organisme des agents pathogènes et autres sources de stimulation potentiellement néfastes pour l'organisme constituent les barrières physiques. Au niveau de certains tissus, des sécrétions comme le mucus, les larmes, la salive et l'urine empêchent le contact direct et permettent d'éliminer des agents dangereux pour l'organisme. La présence d'acides gras à la surface de la peau ou le pH de certaines cavités (pH 2 dans l'estomac ou pH 8 dans le gros intestin) constituent des barrières chimiques qui limitent certaines agressions. Lorsque les

barrières physiologiques sont rompues, le stimulus néfaste arrive à activer le système immunitaire via de multiples outils de reconnaissance (Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

1.2.1.2 Reconnaissance des stimuli néfastes

La réaction inflammatoire aiguë peut être déclenchée par une multitude de stimuli. Les infections (bactériennes, virales et fongiques) constituent les principales sources de stimulation du système immunitaire. Les traumatismes ainsi que les lésions physiques ou chimiques (irradiations, toxicité chimique) peuvent provoquer des réactions inflammatoires. Les corps étrangers, les ischémies, les nécroses peuvent également déclencher une réponse inflammatoire.

Nos cellules sont capables de reconnaître et d'adapter une réponse envers des éléments structuraux conservés sur des agents pathogènes (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou sur des tissus endommagés (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*). Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de récepteurs de surface ou intra-cellulaires qui sont des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR, *Patterns Recognition Receptor*). Ces PRR sont retrouvés chez de nombreuses cellules (leucocytes des lignées myéloïde et lymphoïdes, cellules épithéliales, fibroblastes etc...). À la nature cellulaire à laquelle appartient le PRR s'associe une multitude de fonctions importantes dans la réponse immunitaire (activation, phagocytose, production de cytokines ou de chimiokines, d'enzymes et de médiateurs pro-inflammatoires). Les principales familles de PRR décrites chez les mammifères sont les TLR (*Toll Like Receptors*), les CLR (*C type Lectin Receptors*), et les RLR (*Retinoic acid –inducible gene like Receptors*) et l'inflammasome (Björnsdóttir, 2015; Genetet, 2002; V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014).

1.2.1.3 Les étapes du processus inflammatoire

Quel que soit la nature du stimulus, la réponse inflammatoire aiguë se manifeste par des étapes très similaires. Seule l'intensité et la durée de la réponse varient. Lorsqu'un stimulus néfaste est détecté, les cellules de l'environnement avoisinant que sont les cellules endothéliales et les leucocytes résidents (macrophages et mastocytes) sécrètent des médiateurs qui permettent la mise en place de la réponse inflammatoire. Elle passe d'abord par une phase vasculaire qui recrute et active les cellules de défense de première ligne, puis se poursuit par une tentative d'élimination de la source du stimulus. Parallèlement à ces deux phases, s'installe progressivement une phase de rémission de l'inflammation qui permettra la réparation des tissus.

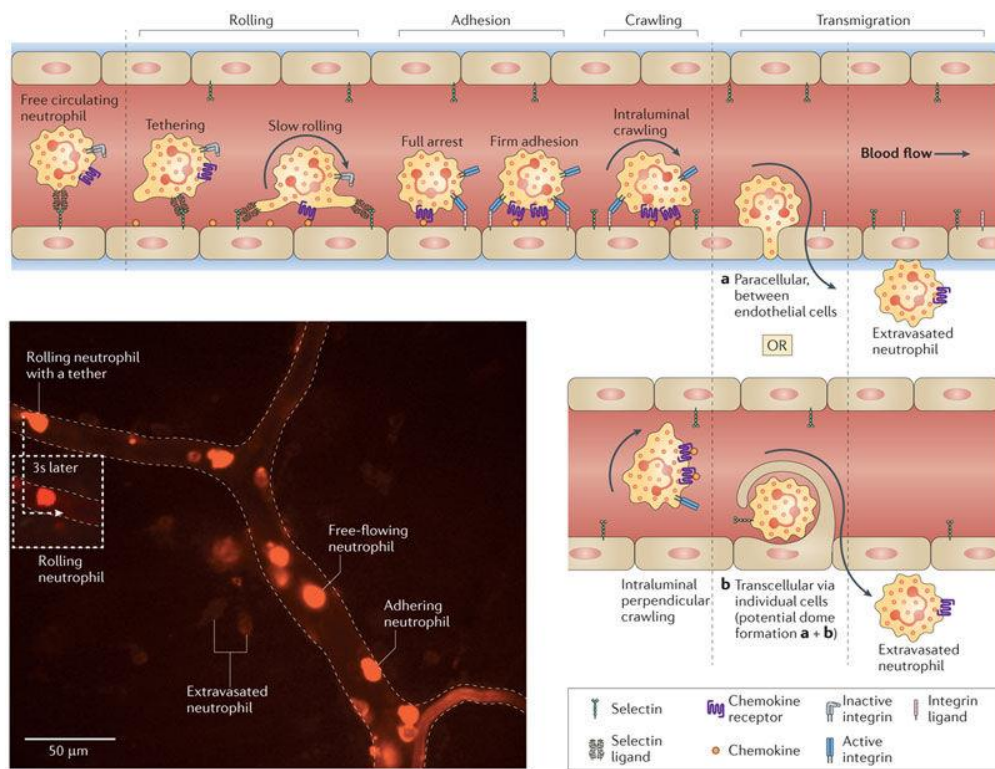
➤ **La phase vasculaire**

Dès les premières secondes de la perception du stimulus néfaste, la réponse immunitaire est activée via un phénomène vasculaire. Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire réflexe, brève et locale, initiée par le système nerveux sympathique qui provoque l'activation des plaquettes. En plus de libérer de la sérotonine et de l'histamine, l'activation des plaquettes conduit à une activation des systèmes du complément et de la coagulation. La bradykinine, l'histamine, et les fragments C3a et C5a issus de ces voies, s'associent aux eicosanoïdes pour induire une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire au site de

l'inflammation. Il s'ensuit une augmentation du flux sanguin et une exsudation plasmatique (avec passage de certains éléments figurés du sang dans les milieux interstitiels) qui sont à l'origine des 4 signes cardinaux de la réaction inflammatoire que sont: rougeur, chaleur, douleur et gonflement auxquels s'ajoute la perte de fonction. La production de cytokines, essentiellement de **TNF** et d'**IL-1** par les leucocytes résidents, provoque l'expression de molécules d'adhésion vasculaire facilitant ainsi le recrutement des neutrophiles sanguins (Genetet, 2002; Owen et al., 2014).

➤ **La phase cellulaire**

Le recrutement des cellules immunitaires circulant vers le site de l'inflammation pour neutraliser le stimulus néfaste est résumé dans cette phase cellulaire. En effet, dans l'heure suivant le début de la réponse inflammatoire, une succession d'évènements permet aux leucocytes (surtout aux neutrophiles) de rejoindre le site de l'inflammation (**Figure 1.55**) (V. Kumar et al., 2013).



Nature Reviews | Immunology

Adaptée de Kolaczowska et Kubes (2013) avec permissions de l'éditeur

Les différentes étapes du recrutement des neutrophiles des vaisseaux sanguins vers les tissus sont illustrées dans la figure ci-dessus. Deux méthodes possibles de transmigration sont reconnues. La migration paracellulaire (entre les cellules endothéliales ; a) et transcellulaire (par les cellules endothéliales ; b). L'image de microscopie montre des neutrophiles marqués en rouge (conjugué avec des anticorps de phycoérythrine) à différents stades de la migration au niveau d'une veinule de peau de souris 2 heures après une infection par *Staphylococcus aureus*

Figure 1.55: Phase cellulaire de recrutement des leucocytes au site du stimulus inflammatoire.

Du fait de l'augmentation du flux sanguin, les globules rouges, cellule anucléée de petite taille, circulent rapidement dans l'axe des vaisseaux sanguins contraignant ainsi les neutrophiles, de plus grosse taille, à circuler en périphérie, proche de la paroi vasculaire : **c'est la margination**. Les molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire activé, interagissent avec les leucocytes marginés provoquant leur ralentissement et leur rotation le long de la paroi des vaisseaux : **c'est le roulement ("rolling")**.

Le rapprochement des neutrophiles à la paroi vasculaire entraîne leur activation par le gradient de chimiokine produit au site de l'inflammation. L'activation des leucocytes se caractérise par des réarrangements de leur cytosquelette qui permet la libération de vésicules contenant des récepteurs de chimiokines et d'intégrines. Cette opération permet aux cellules activées d'être plus sensibles et d'adhérer plus efficacement à la paroi vasculaire. Les leucocytes passent ensuite à travers les cellules endothéliales pour se retrouver dans la matrice extracellulaire. La progression des leucocytes est ensuite stimulée par le gradient de concentration en facteurs chimiotactiques. Il s'agit essentiellement des composantes C3a et C5a du complément, de LTB₄, et de certains médiateurs de la famille des chimiokines (comme, par exemple, l'IL-8).

Le plus souvent, les neutrophiles sont bien les premières cellules sur le site de l'inflammation. Lorsque l'inflammation persiste, les neutrophiles sont progressivement remplacés par des monocytes (inflammation chronique développée plus loin).

➤ *Élimination ou neutralisation de la source de stimulation*

En fonction de la nature du stimulus néfaste, plusieurs voies de suppression peuvent être envisagées. La phagocytose est la première stratégie de neutralisation, surtout dans le cas d'agents pathogènes. Les éléments engloutis sont ensuite détruits lors d'une attaque oxydative qui a lieu dans ces cellules phagocytaires. Ce phénomène résulte de l'explosion oxydative (*Oxidative* ou *respiratory burst* en anglais) médié par la NADPH Oxydase et iNOS, avec pour conséquence la production de radicaux oxygénés ou azotés (anion superoxyde O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , acide hypochloreux $HClO$, peroxydinitrite $ONOO^-$, etc.). La sécrétion de substances toxiques est la seconde voie utilisée par les leucocytes pour détruire des agents pathogènes. Cette opération a lieu surtout lorsque la source du stimulus inflammatoire est difficile à phagocyter (V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014).

1.2.1.4 La résolution de l'inflammation et la réparation des tissus

Cette phase de l'inflammation dépend énormément de la nature du stimulus et de l'intensité de la réaction inflammatoire. Dans les conditions favorables, la source du stimulus est éliminée par les leucocytes et les débris cellulaires sont nettoyés par les macrophages. La réaction inflammatoire est donc suspendue (arrêt du recrutement des leucocytes, neutralisation des médiateurs de l'inflammation, etc.). Les leucocytes sécrètent donc à ce moment des cytokines anti-inflammatoires (ex.: IL-10) qui initient la restauration de l'intégrité structurale et de la fonctionnalité des tissus endommagés. Par contre, lorsque la source de la stimulation échappe à la phase aiguë de l'inflammation, d'autres types cellulaires qui sont les lymphocytes et les

macrophages sont recrutés au site de l'inflammation. C'est ainsi que la phase chronique de l'inflammation s'installe et, là encore, la nature du stimulus jouera un rôle important dans la rémission de la réponse immunitaire (immunisation contre des agents pathogènes ou même la perte complète de la fonction du tissu / organes) (V. Kumar et al., 2013; Owen et al., 2014) .

1.2.2 Les mécanismes de l'inflammation chronique

Lorsque le système de défense innée en place ne permet plus de protéger l'organisme comme évoqué précédemment, des réponses immunitaires adaptatives essentiellement composées par les lymphocytes et les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) prennent le relais.

1.2.2.1 Présentation et étiologie

L'inflammation chronique est un processus inflammatoire de longue durée (de plusieurs jours à plusieurs années) au cours duquel se côtoient un stimulus néfaste persistant, des dommages tissulaires et un mécanisme de guérison enclenché (voire de fibrose). À la différence de la phase aiguë, l'inflammation chronique est caractérisée par :

- Une infiltration de monocytes, incluant des macrophages (dominants) et des lymphocytes,
- Des lésions tissulaires provoquées par les médiateurs de l'inflammation,
- L'initiation de réparation tissulaire, d'angiogenèse (nouvelle vascularisation) et de fibrose.

L'inflammation chronique résulte le plus souvent d'infections persistantes, particulièrement celles causées par des agents pathogènes difficiles à éliminer comme *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose) ou *Treponema pallidum* (syphilis), mais également certains virus et champignons. Les affections auto-immunes, résultant de l'activation excessive et / ou inappropriée du système immunitaire, comme c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou de la maladie de Crohn, présentent une composante chronique de l'inflammation. L'hypersensibilisation vis-à-vis de substances ordinaires de l'environnement ou l'exposition prolongée à des substances potentiellement dangereuses, d'origine exogène (silice) ou endogène (cristaux de cholestérol, d'urate monosodique) peuvent déclencher un processus inflammatoire chronique (V. Kumar et al., 2013).

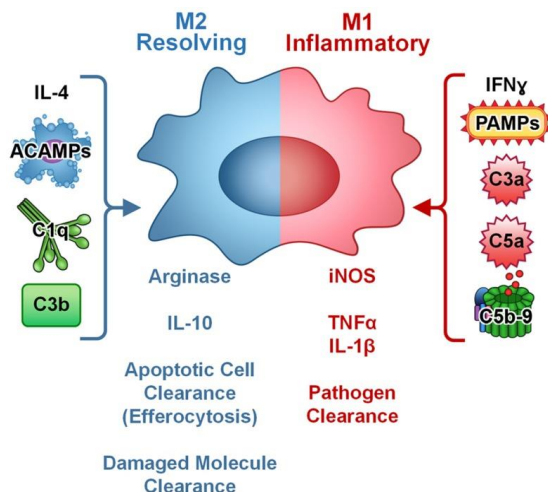
Enfin, l'inflammation chronique est associée à la pathogénèse de nombreuses maladies telles que les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose, le diabète de type 2 et certains cancers.

1.2.2.2 Les cellules et les cytokines de l'inflammation chronique

Comme évoqué précédemment, les principaux acteurs cellulaires de l'inflammation chronique sont les macrophages et les lymphocytes. Cependant, les neutrophiles reprogrammés sont aussi des acteurs importants de cette phase chronique.

➤ **Les macrophages**

Les macrophages résidents ont une fonction essentielle « d'éboueur » car ils assurent l'élimination des débris cellulaires et des agents pathogènes dans les tissus. Ce sont également des effecteurs majeurs des réponses immunitaires spécifiques. Les macrophages proviennent des monocytes. Ces derniers constituent l'essentiel des cellules recrutées au site de l'inflammation 24 h après le début de la réponse inflammatoire. Lorsque les monocytes quittent la circulation sanguine, ils sont transformés en macrophages qui peuvent subir deux types d'activation (**Figure 1.56**) (V. Kumar et al., 2013).



Adaptée avec de Bohlson et al. (2014) ©

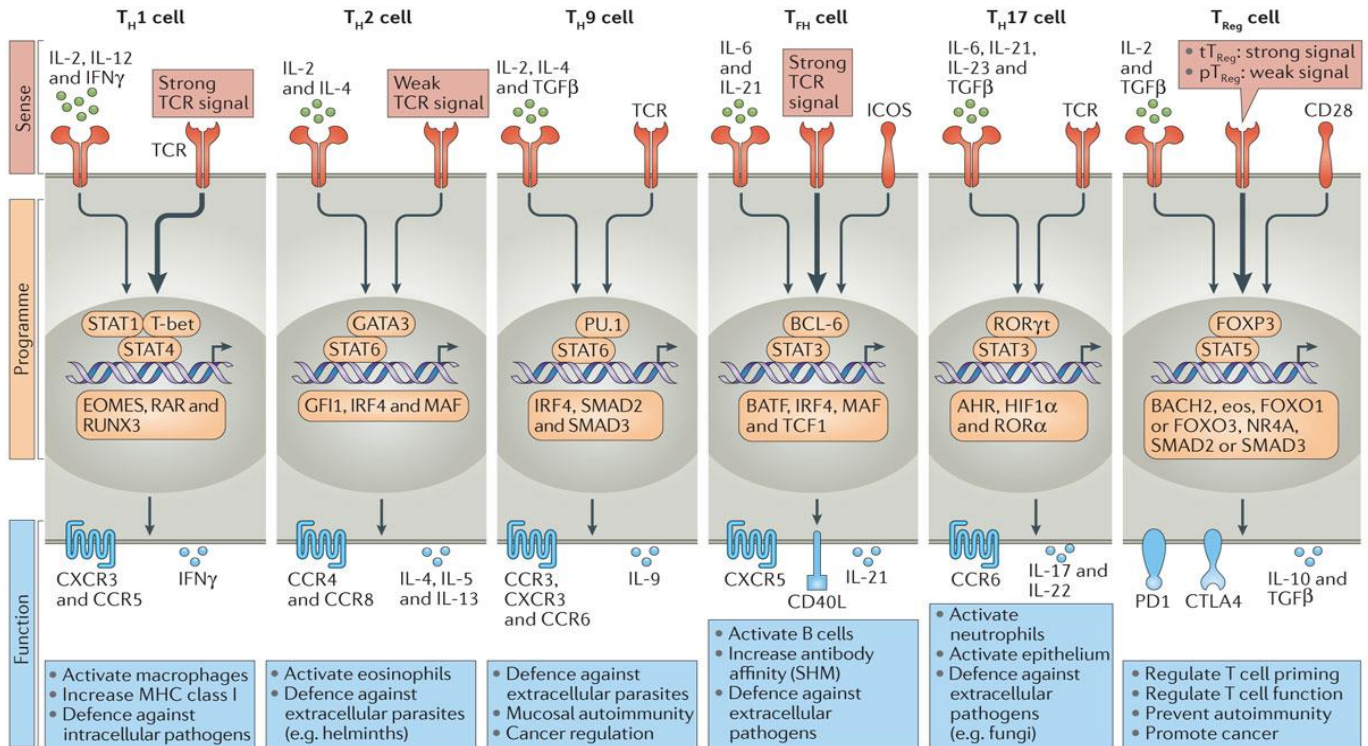
Figure 1.56 :Polarisation et fonctions immunitaires des macrophages.

L'activation classique des macrophages, médiée par des produits d'agents pathogènes, par des cytokines (IFN- γ) ou par les lymphocytes T, potentialise la réponse inflammatoire (production de ROS, d'enzymes antimicrobiennes, et de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages). A l'inverse, l'activation alternative de ces cellules par des cytokines comme IL-4 et IL-13 aura un effet anti-inflammatoire, car elle incitera les macrophages à produire des facteurs de réparation tissulaire (angiogénèse, synthèse de collagène). Il est évident que dans le cadre d'un stimulus persistant (inflammation chronique), c'est la première voie d'activation qui prédomine conduisant à une accumulation des macrophages au site de l'inflammation (V. Kumar et al., 2013).

➤ **Les lymphocytes**

Les lymphocytes B et T sont responsables de la mise en place de deux types de réponses immunitaires spécifiques. La réponse immunitaire spécifique de type cellulaire conduite par les lymphocytes cytotoxiques (T_c) induit la mort de cellules anormales (cancéreuses ou infestées par des agents pathogènes intracellulaires). Les lymphocytes B dirigent une immunité de type humoral. Lors des infections, ils fournissent des anticorps qui neutralisent des agents pathogènes comme les bactéries extracellulaires et leurs dérivés (toxines) et facilitent leur ingestion par des phagocytes.

En fonction des signaux qu'ils reçoivent du site inflammatoire, les lymphocytes T_H (*helper*) ont la capacité de se différencier en différents types d'effecteurs dont les fonctions immunitaires sont résumées dans la **figure 1.57** ci-dessous (Genetet, 2002; Owen et al., 2014).



Nature Reviews | Immunology

Adaptée de DuPage et Bluestone (2016) avec permissions de l'éditeur

AHR, aryl hydrocarbon receptor; BATF, B cell-activating transcription factor; BCL-6, B cell lymphoma 6; CCR, CC-chemokine receptor; CD40L, CD40 ligand; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; CXCR, CXC-chemokine receptor; EOMES, eomesodermin; FOXO, forkhead box O; FOXP3, forkhead box P3; GATA3, GATA-binding protein 3; GFI1, growth-factor independent 1; HIF1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; ICOS, inducible T cell co-stimulator; IFN γ , interferon- γ ; IL, interleukin; IRF4, interferon-regulatory factor 4; MAF, macrophage-activating factor; NR4A, nuclear receptor 4A; PD1, programmed cell death 1; p T_{Reg} cell, peripherally derived regulatory T cell; RAR, retinoic acid receptor; ROR, retinoic acid receptor-related orphan receptor; RUNX3, runt-related transcription factor 3; SHM, somatic hypermutation; STAT, signal transducer and activator of transcription; TCF1, T cell factor 1; TCR, T cell receptor; T_{FH} , T follicular helper; TGF β , transforming growth factor- β ; T_H , T helper; T_{Reg} cell, regulatory T cell; t T_{Reg} cell, thymus-derived regulatory T cell.

Figure 1.57 : Les principaux effecteurs issus de l'activation des lymphocytes T_H .

1.2.2.3 Coopération cellulaire et dénouement de l'inflammation chronique.

En résumé, les macrophages activent les lymphocytes en leur présentant des antigènes apprêtés (fonction de CPA) et en produisant des cytokines comme IL-12 qui participe à cette activation. À leur tour, les lymphocytes T activés sécrètent des cytokines qui favorisent encore le recrutement et l'activation de macrophages au site de l'inflammation. C'est donc ce *Turnover* d'activation et de stimulation qui alimente la réaction inflammatoire chronique. Hormis ces types cellulaires, d'autres leucocytes polymorphonucléaires

peuvent être associés à la réponse inflammatoire chronique. C'est le cas des éosinophiles et des mastocytes lors des réponses antiparasitaires et allergiques, respectivement.

L'agrégation de macrophages activés et de lymphocytes autour du site de l'inflammation forme au cours de certaines affections chroniques (tuberculose, lèpre, maladie de Crohn) des granulomes inflammatoires. Ces derniers sont parfois caractéristiques d'un stade spécifique de la maladie. Ce mécanisme de défense ne permet pas d'éradiquer l'agent causal et peut conduire à la perte de fonction de l'organe associée à de la fibrose (V. Kumar et al., 2013).

2. Les neutrophiles comme modèles d'exploration de la réponse immunitaire

En rappel, les neutrophiles sont les leucocytes majoritaires des granulocytes qui font partie des cellules de l'immunité appartenant au groupe des PolyMorphoNucléaires (PMN) avec les éosinophiles et les basophiles. Ces globules blancs de 12-15 µm de diamètre sont les plus abondants du sang humain (50 à 70% des leucocytes circulants) et constituent une composante essentielle de notre défense contre les agents pathogènes (Björnsdóttir, 2015).

2.1 Physiologie du neutrophile et son rôle dans les réponses immunitaires

2.1.1 *Caractéristiques et métabolisme des neutrophiles quiescents*

Chez l'adulte, environ 100 à 200 milliards de neutrophiles sont produits tous les jours. La production et la maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse requièrent environ 14 jours puis les neutrophiles complètement différenciés rejoignent la circulation sanguine. Chez l'individu en bonne santé, ils sont en état de repos (quiescents) dans la circulation sanguine.

Pour leur métabolisme, les neutrophiles génèrent de l'énergie principalement par glycolyse de leur réserve en glycogène, contrairement à d'autres leucocytes qui génèrent de l'énergie principalement par la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Cette production d'énergie indépendante de l'oxygène leur permet de fonctionner dans des sites à faible teneur en oxygène, comme dans les tissus profonds. Lorsque les cellules sont activées, cette consommation d'oxygène s'accroît considérablement du fait de l'activité de l'oxydase à NADPH qui catalyse la formation de l'anion superoxyde à partir de l'oxygène moléculaire. Comparativement à d'autres leucocytes, les neutrophiles possèdent peu de mitochondries et ces dernières sont plutôt impliquées dans la signalisation de mort cellulaire.

La morphologie nucléaire condensée des neutrophiles reflète une activité transcriptionnelle limitée. En effet, la majeure partie des protéines dont les neutrophiles ont besoin pour accomplir pleinement leurs fonctions sont synthétisées au cours de la maturation dans la moelle osseuse et stockées dans les granules des cellules matures. Ces granules sont impliqués dans la plupart des fonctions effectrices des neutrophiles. De ce point de

vue, en dehors de la moelle, les synthèses de *novo* ont lieu dans des conditions particulières lorsque le neutrophile est activé et concerne essentiellement des cytokines. (Björnsdóttir, 2015)

Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles circulants sont éliminés principalement dans le foie, la rate et la moelle osseuse par apoptose, au bout de 12-18h (Mantovani, Cassatella, Costantini et Jaillon, 2011). Les mécanismes moléculaires de cette mort cellulaire seront détaillés par la suite. Dans le cas contraire, les neutrophiles sont amorcés, activés et des changements moléculaires profonds et majeurs entraînent leur survie tout en leur conférant des fonctions similaires à celles des macrophages (Wright, Moots, Bucknall et Edwards, 2010).

2.1.2 Métabolisme des neutrophiles apprêtés / activés

2.1.2.1 Natures et fonctions des récepteurs du neutrophile

Les récepteurs majeurs retrouvés chez les neutrophiles sont regroupés dans le **tableau 1.11** et peuvent être répartis en quatre familles. Ces récepteurs contribuent essentiellement à l'apprêtement, l'adhésion, la diapédèse, la migration et l'activation des neutrophiles. Ils participent également à l'opsonisation et la phagocytose des agents pathogènes (Futosi, Fodor et Mócsai, 2013).

Tableau 1.11 : Les récepteurs des neutrophiles

Récepteurs aux cytokines et chemoattractants	Récepteurs d'adhésion moléculaire	Récepteurs de reconnaissance d'agents pathogènes	Récepteurs d'opsonisation
<i>Récepteurs peptidiques formylés</i> FPR1 (FPR) ; FPR2 (FPRL1) ; FPR3 (FPRL2)	<i>Selectines and ligands aux selectines</i> L-selectin ; PSGL-1	<i>Récepteurs de type Toll-like</i> TLR1 ; TLR2 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR6 ; TLR8 ; TLR9	<i>Récepteurs de type Fcγ</i> FcγRI ; FcγRIIA (human) ; FcγRIIB (inhibitory) ; FcγRIII (mouse) ; FcγRIIIB (human) ; FcγRIV (mouse)
<i>Récepteurs classiques chemoattractant</i> BLT1 (LTB ₄ -rec.) ; BLT2 (LTB ₄ -rec.) ; PAFR ; C5aR	<i>Integrines</i> LFA-1 (α _L β ₂) ; Mac-1 (α _M β ₂) ; VLA-4 (α ₄ β ₁)	<i>Récepteurs de type C-type lectins</i> Dectin-1 ; Mincle ; MDL-1 ; Mcl ; CLEC-2	<i>Récepteurs de type Fcα</i> FcαRI (human)
<i>Recepteurs de chimiokines</i> CXCR1 (human) ; CXCR2 ; CCR1 ; CCR2		<i>Récepteurs de type NOD-like</i> NOD2 ; NLRP3	<i>Récepteurs de type Fcε</i> • FcεRI ; FcεRII
<i>Récepteurs aux cytokines de type I</i> IL-4R ; IL-6R ; IL-12R ; IL-15R ; G-CSFR ; GM-CSFR		<i>Récepteurs de type RIG-like</i> RIG-I ; MDA5	
<i>Récepteurs aux cytokines de type II</i> IFNAR (IFNα/β-rec.) ; IFNGR ; IL-10R			
<i>Récepteurs aux cytokines de type IL-1</i> IL-1RI ; IL-18R			
<i>Récepteurs aux TNF</i> TNFR1 (p55) ; TNFR2 (p75) ; Fas ; LTBR ; RANK ; RANKL, TRAIL-R2 ; TRAIL-R3			

Adapté de Futosi, Fodor, et Mócsai (2013) ©

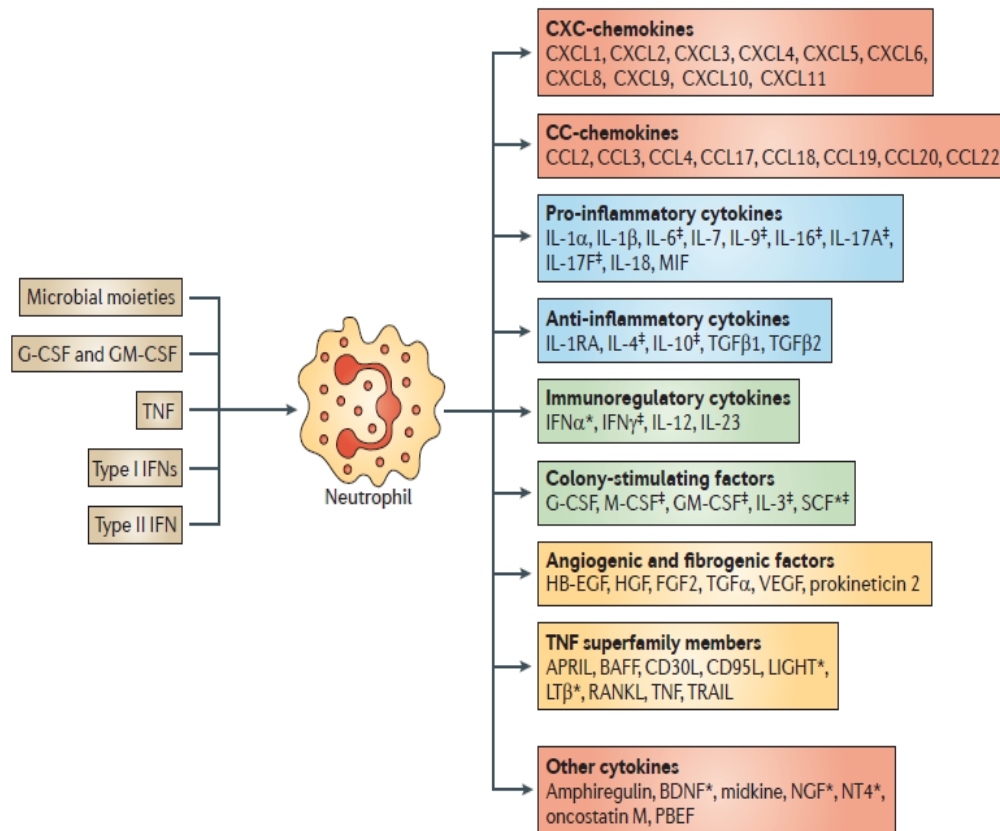
2.1.2.2 Les granules des neutrophiles dans l'activité anti-microbienne

La suppression du stimulus néfaste lorsqu'il s'agit d'un agent pathogène en particulier est la spécialité des neutrophiles. Les mécanismes mis en œuvre pour accomplir cette tâche sont principalement la phagocytose (formation de phagosome), la dégranulation (libération de granules) et la NETosis (déploiement du contenu nucléaire au niveau extracellulaire pour former un réseau de piégeage). Pour cela les neutrophiles doivent transporter en toute sécurité une pléthore de substances dangereuses qui seront déferlées correctement au moment opportun. Par conséquent, ces substances sont pour la plupart dans des organelles de stockage spécialisées. En fonction de leur contenu, quatre types de granules et vésicules intra-cellulaires ont été mis en évidence dans les neutrophiles. Il s'agit des granules azurophiles (primaires), des granules spécifiques (secondaires), des granules à gélatinase (tertiaires) et des vésicules sécrétoires.

Au fur et à mesure que le neutrophile s'active, les granules sont mobilisés et fusionnent avec la membrane plasmique ou les phagosomes en libérant leur contenu dans les environnements respectifs. Les différentes classes de granules démontrent des propensions différentes pour leur mobilisation en réponse à des signaux inflammatoires. Les mécanismes sous-jacents de cette mobilisation différentielle ne sont pas entièrement élucidés. Cependant, le recrutement de chaque type de granules est traditionnellement associé à une étape particulière de l'activation des neutrophiles. L'apprêtement de ces derniers lors du contact avec les sélectines de l'endothélium ou les chimioattracteurs provoque la mobilisation des vésicules sécrétoires. Au fur et à mesure que le neutrophile traverse l'endothélium, d'autres signaux d'activation initient la mobilisation des granules de gélatinase libérant ainsi les métallo-protéases. Sur le site inflammatoire, l'activation complète des neutrophiles enclenche la mobilisation des granules azurophiles et spécifiques qui initieront l'explosion oxydative (Amulic, Cazalet, Hayes, Metzler et Zychlinsky, 2012; Björnsdóttir, 2015).

2.1.2.3 Les cytokines produites par les neutrophiles

Comme souligné précédemment, les neutrophiles ont longtemps été considérés comme dépourvus d'activité transcriptionnelle et très peu capables d'effectuer des synthèses protéiques. Mais il est démontré aujourd'hui que ces derniers peuvent synthétiser et libérer une large gamme de médiateurs protéiques qui régule la réponse immunitaire innée et adaptative. (Matsukawa et Yoshinaga, 1999; Tecchio, Micheletti et Cassatella, 2014). La **figure 1.58** fait une synthèse des cytokines que les neutrophiles peuvent exprimer.



Adapté de Mantovani et al. (2011) avec permissions de l'éditeur.

*Sur la base d'études portant uniquement sur l'ARNm. ‡ Données controversées pour les neutrophiles humains.

Figure 1.58 : Aperçu des cytokines produites par les neutrophiles.

La production de cytokines par des neutrophiles activés est étonnante surtout par sa diversité. Même si la production de cytokines est largement dépendante des agents de stimulation, la quantité de cytokines produites par les neutrophiles reste largement inférieure à celle des phagocytes mononucléaires. C'est donc à juste titre que les macrophages et les monocytes sont adulés pour les essais expérimentaux *in vitro* pour l'expression de cytokines. Cependant, cela semble moins évident pour les explorations *in vivo* si l'on considère que les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur le site de l'inflammation et que le nombre de neutrophiles circulants est presque 20 fois supérieur à celui des monocytes (Witko-Sarsat, Rieu, Descamps-Latscha, Lesavre et Halbwachs-Mecarelli, 2000).

2.1.2.3 La mort des neutrophiles

Comme tous les organismes, les cellules ont une durée de vie limitée qui va chez l'homme, d'une dizaine d'heures à des dizaines d'années. Cette mort cellulaire programmée est un processus physiologique vital pour le maintien du *turnover* et le développement de cellules saines dans les tissus. Le dysfonctionnement de ce mécanisme biologique peut être à l'origine du développement de nombreuses pathologies graves (cancer,

maladies auto-immunes, neuro-dégénérescence). Bien que plusieurs modalités de mort cellulaire programmée aient été mises en évidence, l'apoptose reste la forme la plus décrite et étudiée (V. Kumar et al., 2013).

Un second mécanisme de mort cellulaire, qualifiée de violente est décrit. Cette dernière est caractérisée par la rupture de la membrane plasmique et par la fuite des composants intra-cellulaires. Il s'agit notamment de la nécrose qui s'avère être un processus incontrôlé de destruction cellulaire. Les DAMPs libérés lors de ce processus contribuent activement à recruter et à déclencher les acteurs du système immunitaire. La nécrose cellulaire est très souvent causée par des dommages physiques ou l'exposition à des agents toxiques incluant les toxines microbiennes (V. Kumar et al., 2013).

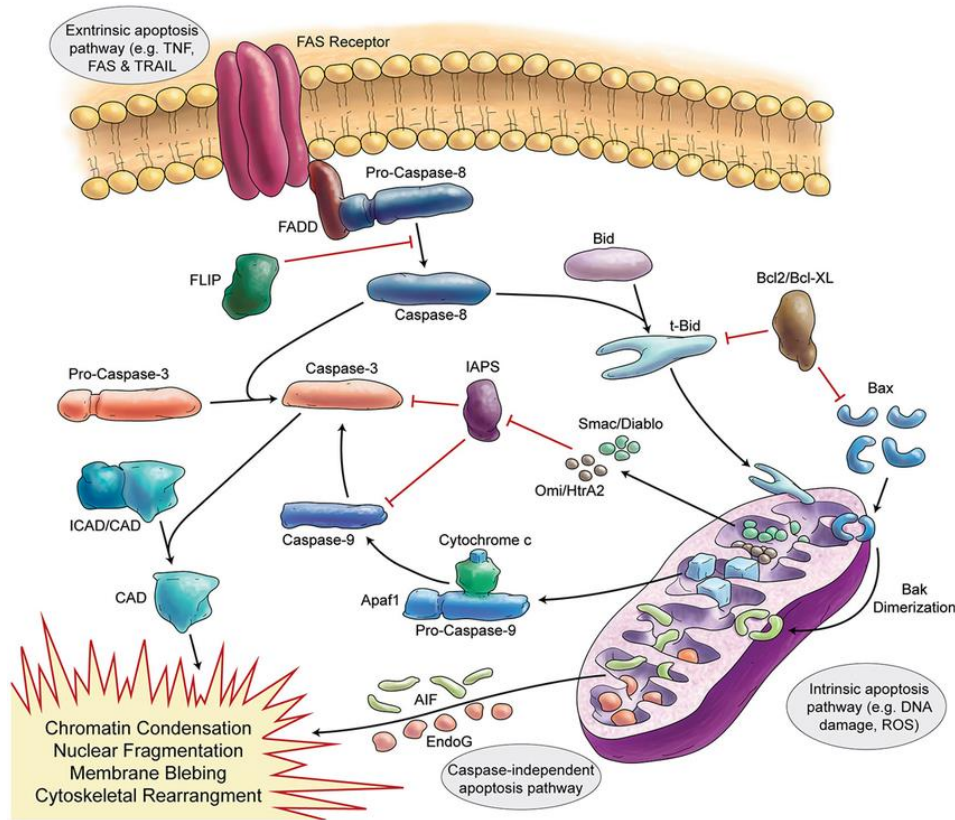
➤ **Généralités sur la mort cellulaire programmée**

La mort cellulaire, lorsqu'elle est programmée, est marquée par des modifications morphologiques caractéristiques. Les cellules subissent une désintégration progressive des structures internes qui contribuent à la perte de nombreuses fonctions. Au microscope optique et électronique, il est possible d'observer un rétrécissement de la cellule et une rétraction du noyau (pycnose). Le cytoplasme dense, les organites aplatis, voire compactés et la chromatine condensée dans le noyau sont les principales caractéristiques morphologiques des cellules ayant entamées une phase apoptotique. La fragmentation du noyau (caryorrhexie) puis celle de la cellule entière en corps apoptotiques qui seront rapidement éliminés par les macrophages, caractérisent la phase ultime de l'apoptose. Dans les conditions physiologiques, l'élimination de ces fragments s'opère sans nécrose secondaire ni sécrétion de cytokines qui pourrait déclencher une réaction inflammatoire (Elmore, 2007).

Les mécanismes biochimiques de l'apoptose sont très complexes et font intervenir de nombreuses voies de signalisation. Deux principales voies pro-apoptotiques sont décrites dans la littérature (**Figure 1.59**) (Elmore, 2007; Jin et El-Deiry, 2005; Owen et al., 2014).

La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque est initiée par stimulation de récepteurs membranaires de la mort. Ces derniers sont membres de la superfamille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) dont les ligands et récepteurs correspondants les plus connus sont FasL / FasR, TNF- α / TNFR1 et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) qui peuvent se fixer sur 4 récepteurs distincts TRAIL-R1 à 4. La transduction intra-cellulaire du signal entraîne le recrutement de molécules adaptatrices dans le but de recruter et activer la pro-caspase 8. Cette caspase active ensuite des caspases effectrices qui déclencheront à leur tour, des enzymes pro-apoptotiques provoquant la mort programmée des cellules (apoptosis).



Adaptée de Marzban et al. (2015) 

Figure 1.59: Les mécanismes de l'apoptose cellulaire

La voie intrinsèque de l'apoptose

En revanche, la voie intrinsèque d'apoptose est stimulée au niveau intra-cellulaire par des signaux agissant directement sur les mitochondries et sur la cellule de façon générale. Non exhaustifs, ces signaux peuvent être des radiations, des toxines, une hyperthermie, des infections virales ou des radicaux libres. Ces signaux perturbent la perméabilité mitochondriale avec, pour conséquence directe, la perte du potentiel transmembranaire et la libération de deux classes de protéines pro-apoptotiques précédemment séquestrées.

La première classe de protéines pro-apoptotiques regroupe le cytochrome C, la protéine Smac/DIABLO et la sérine protéase HtrA2. Ces protéines contribuent à l'activation de la cascade des caspases dépendantes des mitochondries à partir de la pro-caspase-9. Le second groupe de protéines pro-apoptotiques comprend le facteur d'induction de l'apoptose (AIF, *Apoptosis Inducing Factor*) et les endonucléases G et CAD (*Caspase-Activated DNase*) qui sont relargués de la mitochondrie à un stade bien avancé de l'apoptose. Ces protéines sont à l'origine de la fragmentation de l'ADN.

L'apoptose induite par la voie intrinsèque est régulée et contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2. Il s'agit d'une vingtaine de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Bax (*Bcl-2 Associated X protein*), Bad (*Bcl-2 Associated Death promoter protein*), Bac (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) Bid (*Bcl-2 homology-3 (BH-3)-interacting domain death agonist*), Bim (*Bcl-2 interacting*

protein) et Bik (*Bcl-2 interacting killer*) sont les membres pro-apoptotiques de cette famille. Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*) et Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et ses isoformes (Bcl-XL Bcl-XS, Bcl-w) sont les protéines anti-apoptotiques. Ces protéines régulent la perméabilité de la membrane mitochondriale, donc contrôlent le relargage du cytochrome C.

Selon ces deux voies, la cascade des caspases apparaît donc essentielle dans la régulation de l'apoptose. Exprimées sous forme de pro-enzymes inactives dans la plupart des cellules, l'induction de l'apoptose entraîne une activation de caspases initiales (2, 8, 9, 10) qui conduiront irréversiblement à l'activation de caspases effectrices (3, 6, 7). D'autres caspases sont connues pour leur implication dans d'autres mécanismes comme l'inflammation (1, 4, 5). La caspase 3 est l'effecteur le plus important de l'apoptose cellulaire. Lorsqu'elle est activée, elle clive l'endonucléase CAD complexé à son inhibiteur dans les cellules prolifératives. La CAD, ainsi libérée, dégrade l'ADN d'où l'aspect condensé du noyau.

Outre l'apoptose caspase-dépendante, de nombreuses études ont mis en évidence des voies alternatives de mort (caspase-indépendante). Ces voies conduisent à la libération de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie indépendamment des caspases comme AIF et les endonucléases (Bröker, Krut et Giaccone, 2005; Kroemer et Martin, 2005; Pradelli, Bénateau et Ricci, 2010).

➤ ***Les acteurs majeurs de l'apoptose chez les neutrophiles***

Des milliards de neutrophiles meurent chaque jour et il est généralement admis que la forme physiologique de leur disparition est l'apoptose. L'autophagie et la NETose sont des formes de mort également décrites dans la littérature pour les neutrophiles.

Les neutrophiles sénescents subissent donc une mort spontanée aussi appelée mort constitutive qui contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire. Le mécanisme initial qui déclenche cette apoptose spontanée chez les neutrophiles n'est pas complètement connu. Cependant, toutes les hypothèses convergent vers une apoptose spontanée issue d'un processus intrinsèque.

L'équilibre rédox au sein des neutrophiles sénescents figure parmi les hypothèses d'amorçage de l'apoptose spontanée. L'augmentation des ROS dans ces cellules vieillissantes liée à la diminution du taux de molécules anti-oxydantes endogènes comme le glutathion provoquerait probablement le mécanisme d'amorçage de la mort. Les variations dans les niveaux d'expression des protéines pro et anti-apoptotiques dues aux faibles taux de transcription couplés à une demi-vie courte des protéines anti-apoptotiques constituent également une hypothèse plausible d'amorçage de l'apoptose (Kobayashi, Voyich, Whitney et DeLeo, 2005; Luo et Loison, 2008).

Nous nous proposons de passer en revue les composantes moléculaires essentielles, impliquées dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles

Les récepteurs de la mort

La voie extrinsèque de l'apoptose est assurée par les récepteurs de type TNF qui participent à des effets pro ou anti-apoptotiques. Chez le neutrophile, une survie a été mise en évidence pour des stimulations par des doses faibles de TNF (0,1-1 ng / mL), alors qu'un effet pro-apoptotique dominant est obtenu à des doses plus élevées de TNF (10-100 ng / mL). Il a été démontré que cette voie extrinsèque n'est pas impliquée dans l'apoptose constitutive des neutrophiles (Akgul et Edwards, 2003; El Kebir et Filep, 2010).

Les caspases et protéines de la famille des Bcl-2

Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose des neutrophiles font appel aux caspases initiateuses et effectrices classiques décrites précédemment. Aussi, l'apoptose spontanée des neutrophiles repose essentiellement sur un équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les neutrophiles matures expriment de façon constitutive les protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim) mais également les membres anti-apoptotiques Mcl-1, A1 et Bcl-XL (en moindre quantité), mais pas Bcl-2. Mcl-1 est la protéine prédominante du groupe des Bcl-2 anti-apoptotiques dans les neutrophiles. Il a été démontré que son niveau d'expression est étroitement lié à la cinétique de survie des neutrophiles. Des données récentes indiquent que les niveaux de Mcl-1 chutent avant l'apoptose même en présence d'inhibiteurs de caspase. Ceci indique donc que Mcl-1 fonctionne comme un régulateur et une cible en aval de l'activation des caspases (Geering et Simon, 2011; Luo et Loison, 2008).

Les autres protéines mitochondriales

Les neutrophiles matures contiennent un faible nombre de mitochondries. La perte de l'intégrité membranaire de la mitochondrie conduit à la libération de ces protéines pro-apoptotiques mais également du cytochrome c, de Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) / DIABLO (Direct IAP-Binding protein with low pI), AIF (Apoptosis-Inducing Factor), et l'endonuclease qui sont à l'origine de l'apoptose constitutive et stimulée chez les neutrophiles. (Geering et Simon, 2011; Luo et Loison, 2008)

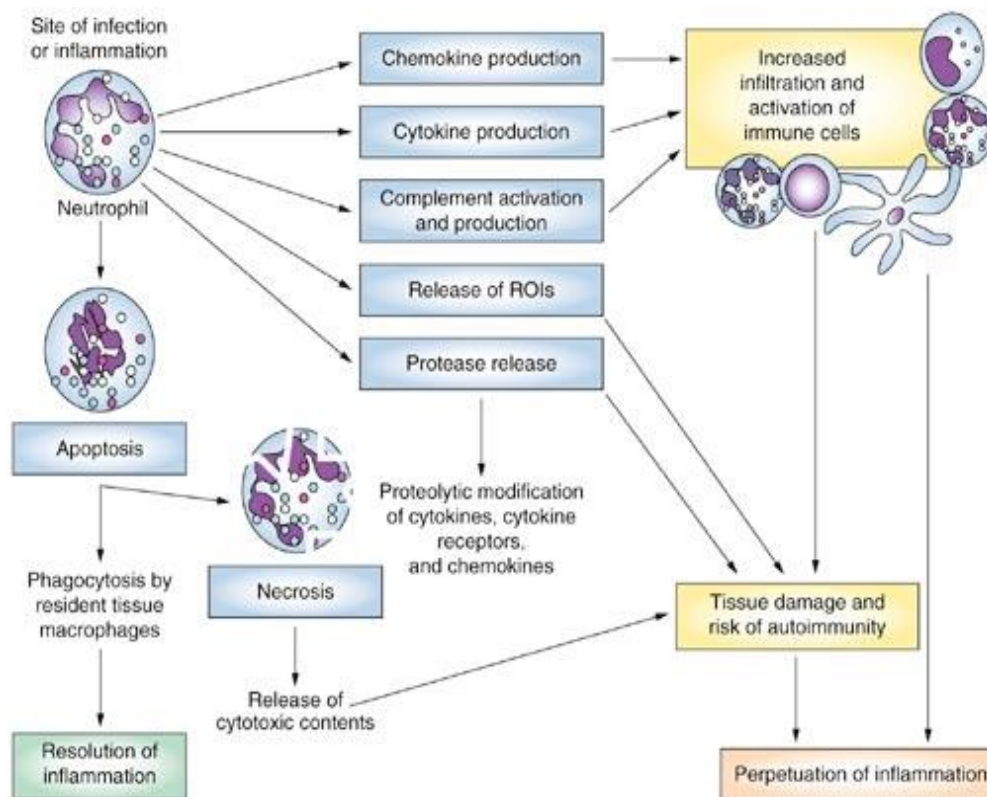
Les ROS

La production de ROS est une caractéristique majeure de la biologie des neutrophiles. Ces ROS sont de véritables molécules de signalisation qui initient la voie intrinsèque de l'apoptose. Par contre, à des teneurs relativement importantes, ces ROS générées par l'oxydase à NADPH à la suite d'une explosion oxydative importante peuvent provoquer une mort cellulaire violente pouvant aller jusqu'à la nécrose (Geering et Simon, 2011).

2.1.2 Rôle des neutrophiles dans la pathogénèse et la modulation des maladies inflammatoires

Depuis quelques années maintenant, il est démontré que les neutrophiles assurent des fonctions plus étendues que l'on ne pouvait imaginer. Ces cellules de l'immunité contribuent activement à la pathogénèse d'un certain nombre de maladies humaines et même à l'évolution de ces maladies (Kobayashi et al., 2005; Mantovani et al., 2011).

Considérant la toxicité des médiateurs que les neutrophiles transportent, leur déploiement et leur élimination après la réponse inflammatoire doivent être minutieusement contrôlés afin de limiter les dommages. L'apoptose et la survie des neutrophiles sont des points de contrôle essentiels dans la résolution de l'inflammation. La résolution de l'inflammation est un processus actif qui limite davantage l'infiltration des leucocytes et élimine les cellules apoptotiques des sites enflammés. Ce processus est essentiel pour la maintenance de l'homéostasie tissulaire et s'il est entravé, il conduit à la persistance de l'inflammation qui contribue à de nombreuses maladies (**Figure 1.60**) (Amulic et al., 2012).



Adaptée de Eyles et al. (2006) avec permissions de l'éditeur.

Figure 1.60 : Conséquences du devenir des neutrophiles après la réponse inflammatoire.

2.1.2.1 L'apoptose des neutrophiles et la résolution de l'inflammation

La bonne résolution de la réponse inflammatoire repose essentiellement non seulement sur la diminution de l'afflux de neutrophiles et le recrutement de monocytes mais également sur l'élimination rapide de ces cellules infiltrées et la régénération des structures tissulaires endommagées. L'apoptose apparaît comme un aspect central car elle intervient à plusieurs niveaux pour orchestrer la résolution de l'inflammation (Amulic et al., 2012).

En effet, les neutrophiles au stade de l'apoptose ne sont plus fonctionnels. C'est-à-dire qu'ils sont notamment peu sensibles aux facteurs chimiotactiques car leurs récepteurs de surface et les molécules d'adhésion sont sous-exprimés. Le métabolisme, comme l'explosion oxydative, et la dégranulation sont

également réduits. L'apoptose réduit donc, non seulement le nombre de neutrophiles présents sur le site de l'inflammation, mais abroge aussi des signaux d'activation des neutrophiles les rendant ainsi de moins en moins réceptifs aux cytokines pro-inflammatoires (Luo et Loison, 2008).

L'évolution du profil des métabolites produits au cours de la phase de résolution pourrait aussi expliquer l'atténuation de la réponse pro-inflammatoire des neutrophiles. Ces cellules sont souvent considérées comme des acteurs passifs de la résolution de l'inflammation dont le sort est la mort, puis l'élimination rapide et silencieuse. Cependant, ils sont également impliqués dans l'induction active de la résolution par la production de médiateurs de la résolution.

➤ **Les médiateurs lipidiques anti-inflammatoires**

Au cours de la résolution, le micro-environnement cellulaire du site de l'inflammation (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, plaquettes et leucocytes) produit plutôt des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires. Il s'agit essentiellement de lipoxine A4 (LXA4), des résolvines (E1, E2, D1, D2,) et de protectines. Ces médiateurs lipidiques inhibent la migration trans-endothéliale des neutrophiles et leur infiltration tissulaire. Enfin, ces médiateurs lipidiques favorisent la phagocytose non inflammatoire des neutrophiles apoptotiques par les monocytes et les macrophages sans libération de médiateurs pro-inflammatoires (Amulic et al., 2012).

➤ **Clairance des neutrophiles et cytokines anti-inflammatoires**

Tout aussi important, l'élimination des neutrophiles apoptotiques est un aspect majeur pour la résolution de l'inflammation. Bien que les mécanismes d'élimination des neutrophiles *in vivo* ne soient pas complètement élucidés, il semblerait que ce phénomène implique les macrophages dans la rate et la moelle osseuse, ainsi que les cellules de Kupffer dans le foie. Dans ces organes, les neutrophiles en cours d'apoptose expriment des signaux de reconnaissance «*find-me*» aux premiers stades de la mort cellulaire qui attirent les phagocytes, puis des signaux "*eat-me*" pour leur ingestion (El Kebir et Filep, 2013; Geering et Simon, 2011).

La phagocytose des neutrophiles apoptotiques reprogramme également les macrophages qui adoptent un phénotype anti-inflammatoire comme nous l'avions évoqué précédemment. En effet, la phagocytose des neutrophiles apoptotiques polarise les macrophages pro-inflammatoires (M1) en macrophages anti-inflammatoires (M2). Ces derniers sécrètent des médiateurs comme IL-10 et TGFβ associés à la résolution de l'inflammation et à la réparation des tissus. L'IL-10 provoque également chez les neutrophiles la production de d'IL-1RA (*interleukin-1 receptor antagonist*) qui contribue à limiter les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 (Amulic et al., 2012; Luo et Loison, 2008).

2.1.2.2 Conséquences de la survie des neutrophiles

Dans le micro-environnement inflammatoire, les neutrophiles sont exposés de façon récurrente à divers signaux de survie. Constitués essentiellement de médiateurs pro-inflammatoires, de molécules issues d'agents

pathogènes et par les conditions environnementales telles que l'hypoxie, ces signaux prolongent la survie des neutrophiles.

Les neutrophiles activés et persistants sur le site de l'inflammation sécrètent des cytokines et des chimiokines critiques dans l'expansion de la réponse inflammatoire. Par exemple, l'IL-8 produite abondamment sert principalement à recruter d'autres neutrophiles. Aussi, l'IL-1 β et le TNF dérivés de ces neutrophiles contribuent à moduler la réponse inflammatoire des autres cellules de l'immunité. Il est évident que les neutrophiles interagissent avec pratiquement toutes les autres cellules immunitaires et exercent, de ce fait, un rôle primordial d'immuno-régulateur sur les sites périphériques et les ganglions lymphatiques. En plus des cytokines, les neutrophiles infiltrés libèrent d'autres médiateurs de signalisation comprenant les granules et les ROS qui favorisent les lésions tissulaires (El Kebir et Filep, 2010; Soehnlein, Steffens, Hidalgo et Weber, 2017).

Tous ces événements permettent aux neutrophiles de conduire activement des processus inflammatoires entraînant des dommages plus conséquents. Ils sont ainsi impliqués dans le développement de maladies incluant des maladies pulmonaires chroniques, les maladies cardiaques, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et même les cancers. La présence d'anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) caractéristique de certaines angéites auto-immunes témoigne incontestablement de l'implication de ces cellules dans le processus inflammatoire chronique et sa régulation par l'immunité adaptative (Caielli, Banchereau et Pascual, 2012; Mantovani et al., 2011; Witko-Sarsat et al., 2000; Wright et al., 2010).

2.1.2.3 L'apoptose des neutrophiles comme stratégie thérapeutique

L'accélération, en temps opportun, de l'apoptose des neutrophiles est essentielle pour la résolution de l'inflammation. De ce point de vue, cette approche pourrait être envisagée en thérapeutique pour moduler la résolution de l'inflammation dans certaines pathologies (Witko-Sarsat et al., 2000).

De nombreux agents pharmacologiques ciblent directement l'apoptose, bien qu'ils soient en cours de développement pour de potentielles thérapies anti-cancéreuses. Cependant, ils peuvent également être utiles pour traiter les maladies auto-immunes. Ces agents comprennent, entre autres, des agonistes des récepteurs de la mort, des activateurs de caspases, des inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 etc... (Wright et al., 2010).

➤ *Les thérapies ciblant les récepteurs de la mort*

La manipulation de l'apoptose via les voies du récepteur de la mort offre un potentiel thérapeutique impressionnant dans la prévention et/ou le traitement des maladies inflammatoires.

L'utilisation des anticorps anti-TNF empêchant le TNF de se fixer et d'activer son récepteur a fait ses preuves au vu du rôle que cette cytokine joue dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires chroniques. L'Etanercept® (Enbrel) et l'Infliximab® (Remicade) sont des anti-TNF utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis et de la maladie de Crohn (Akgul et Edwards, 2003; Wright et al., 2010).

Une seconde approche consistant en la stimulation des récepteurs Fas a été suggérée pour induire l'apoptose dans les cellules immunitaires car les neutrophiles resteraient sensibles à cette activation par la voie extrinsèque malgré une altération de la voie intrinsèque. Même si d'éventuels ligands de la mort devraient théoriquement fournir de meilleures réponses, comparativement aux anti-TNF, la sélectivité de ces ligands pour les cellules immunitaires qui permettrait alors d'épargner d'autres cellules exprimant des récepteurs Fas *in vivo* restent un véritable défi (El Kebir et Filep, 2010).

➤ ***Inhibition de Mcl-1.***

Plusieurs inhibiteurs des membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés ou développés récemment, y compris l'apogossypol / gossypol, TW-37 et ABT-737. Bien que le gossypol et le TW-37 soient des inhibiteurs de Bcl-2, ABT-737 est un inhibiteur de Bcl-2, Bcl-xL et de Bcl-w. Cependant, peu d'effet a été rapporté sur Mcl-1 ou A1. Jusqu'à présent, aucun inhibiteur sélectif de Mcl-1 n'a été signalé et l'effet des inhibiteurs de Bcl-2 sur la viabilité des neutrophiles ou sur la résolution de l'inflammation n'a pas été évaluée (Geering et Simon, 2011).

➤ ***Inhibiteurs de la kinase dépendants de la cycline***

Les neutrophiles n'étant pas des cellules prolifératives, les CDK ont longtemps été négligés dans la biologie des neutrophiles. Même si ces protéines sont exprimées à des taux relativement faibles dans les neutrophiles matures, l'utilisation d'inhibiteurs de CDK semble accélérer l'apoptose. Les inhibiteurs de CDK comme la R-roscovitine (Seliciclib ou CYC202), NG75 et hymenialdisine induisent une apoptose dans des cellules inflammatoires en accélérant la dégradation de Mcl-1. L'administration de R-roscovitine au pic de l'inflammation atténue l'accumulation de leucocytes et accélère la résolution de l'inflammation pleurale dans un modèle induit par la carrhagénine chez des souris males (El Kebir et Filep, 2010; Fox, Leitch, Duffin, Haslett et Rossi, 2010; Geering et Simon, 2011).

➤ ***Inhibiteur NF- κ B***

NF- κ B joue un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes inflammatoires et les effets anti-inflammatoires potentiels des bloqueurs de NF- κ B ont largement été étudiés. En revanche, très peu d'informations sont disponibles sur leur impact sur la résolution de l'inflammation (El Kebir et Filep, 2010). Par contre, comme la plupart des facteurs de transcription NF- κ B régule l'expression d'un large éventail de protéines dont certaines sont impliquées dans la résolution de l'inflammation. L'utilisation donc d'inhibiteur pourrait être plus néfaste que bénéfique pour la résolution de l'inflammation *in vivo*. La gliotoxine, le SN-50, la curcumine et le pyrrolidin-dithiocarbamate, sont des inhibiteurs connus de la voie de NF- κ B (Geering et Simon, 2011). Il faut aussi rappeler que certains de ces inhibiteurs puissants de la voie de NF- κ B déjà testés en essais cliniques ont démontré de nombreux effets secondaires, parfois graves, ayant conduit à une perte d'intérêt de ces molécules. Il y a toujours, cependant, une porte ouverte à de nouveaux produits mieux tolérés et mieux ciblés.

En somme, bien que primordiales dans le traitement des maladies inflammatoires, les stratégies de thérapies basées sur l'induction de l'apoptose des neutrophiles restent encore très peu étudiées.

2.2 Exploration de la viabilité des neutrophiles

Des difficultés ont été rapportées quant au choix de modèle à retenir pour l'exploration des fonctions des neutrophiles.

D'abord, il s'agit de cellules complètement différenciées donc qui ne se divisent pas en culture. Les lignées cellulaires disponibles comme les cellules HL-60 (*Human promyelocytic leukemia cells*) ne sont pas phénotypiquement identiques aux neutrophiles primaires et ont des granules immatures. Leur utilisation comme modèles d'études fonctionnelles est donc limitée (Björnsdóttir, 2015).

En immunologie expérimentale, les souris sont les modèles largement utilisés. Il existe toutefois des différences significatives entre les neutrophiles murins et humains. Chez les souris, les neutrophiles ne représentent que 10 à 25% des leucocytes circulants alors que chez l'homme ils vont de 50 à 70%. En outre, les neutrophiles murins contiennent également des concentrations nettement plus faibles de MPO rendant ces modèles limités en ce qui concerne les études fonctionnelles des neutrophiles humains (Björnsdóttir, 2015).

Enfin, les neutrophiles sont des cellules très sensibles qui sont rapidement apprêtées voire activées par le moindre stimulus. Selon leur nature, ces stimulations peuvent entraîner la mise en place des mécanismes de défense conférant ainsi à ces cellules des propriétés moléculaires complètement différentes de celles de neutrophiles quiescents. Pour cette raison, les expériences *in vitro* impliquant l'utilisation de neutrophiles sanguins fraîchement isolés doivent être conduites minutieusement, surtout lors de l'exploration des fonctions complètes de neutrophiles. Dans le cas contraire, les résultats obtenus seraient difficilement interprétables car les neutrophiles apprêtés / activés présentent plus de similitudes avec les macrophages qu'avec les cellules quiescentes (Roberts, 2017).

L'étude de l'apoptose des neutrophiles *in vitro* est étroitement liée à la pureté de la population et à l'état des neutrophiles, donc varie tout simplement en fonction de la technique d'isolement utilisée. La durée de vie des neutrophiles est facilement influencée par une grande variété de facteurs. Ainsi, il est important de minimiser l'activation expérimentale des neutrophiles qui prolonge artificiellement la durée de leur vie dans les cultures *in vitro*. Plus particulièrement, le contrôle du pH, de la température, de la teneur en oxygène, de la densité cellulaire et la présence de sérum sont des facteurs clés qui influenceront l'interprétation des données expérimentales (Dorward, Rossi, Dransfield et Lucas, 2014).

Compte tenu de la complexité des processus impliqués dans le phénomène de l'apoptose, une multitude d'approche peut être envisagée pour les études *in vitro*. L'observation de changements morphologiques (retraction cellulaire, formation de corps apoptotiques et condensation de la chromatine), la perméabilité mitochondriale avec perte du potentiel de membrane mitochondrial, le clivage d'ADN, l'activation des caspases et l'externalisation de phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine au niveau de la membrane plasmique sont autant d'approches décrites dans la littérature (Dorward et al., 2014).

2.2.1 Analyse de la morphologie cellulaire

Les neutrophiles en apoptose peuvent être identifiés par les modifications morphologiques qu'ils subissent comme la condensation caractéristique de leur noyau et le rétrécissement cellulaire. Cette caractérisation morphologique au microscope optique ou électronique permet une évaluation rapide, précise et à moindre coût de l'apoptose des neutrophiles. Des colorants comme le Diff-Quick sont très souvent utilisés pour une meilleure visualisation du contenu cellulaire des neutrophiles. Enfin, la microscopie électronique fournit une analyse structurale bien détaillée des changements morphologiques opérés au cours de l'apoptose (Dorward et al., 2014).

2.2.2 Tests de colorant d'exclusion

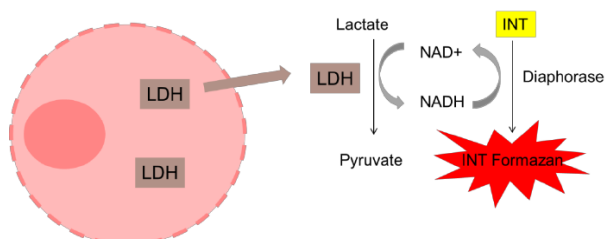
Ces méthodes sont basées sur l'intégrité membranaire des cellules viables qui restent imperméables au colorant utilisé. Les colorants d'exclusion sont traditionnellement utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire, mais ne distinguent pas les cellules apoptotiques de celles en nécrose. Le bleu trypan, qui implique l'utilisation d'un hémocytomètre pour le comptage de cellules présentes dans un volume défini de suspension cellulaire, est la méthode de routine la plus utilisée. Il colore les cellules non viables en bleu distinct au microscope optique (Louis et Siegel, 2011).

2.2.3 Évaluation du métabolisme cellulaire

Le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) est devenu une méthode de référence pour l'exploration de la toxicité des produits pharmaceutiques et des anti-cancéreux. Cette méthode spectro-photométrique évalue le métabolisme des cellules viables qui conservent une activité réductase dépendante de NADH et de NADPH. Ces enzymes réduisent le MTT (légèrement jaune) en bleu formazan (violet) permettant ainsi d'apprécier la viabilité de cellules à travers leur métabolisme (Kupcsik, 2011).

2.2.4 Évaluation du relargage de lactate déshydrogénase (LDH)

Il s'agit surtout d'une méthode d'évaluation de la toxicité cellulaire. En effet, les cellules endommagées libèrent des enzymes cytoplasmiques (**Figure 1.61**) comme la lactate déshydrogénase dont la mesure de l'activité permet d'apprécier l'état de l'intégrité membranaire des cellules (Lobner, 2000).

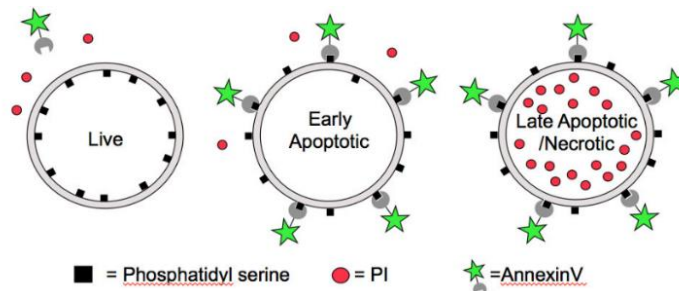


Adaptée de Forest et al. (2015) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.61 : Principe du test LDH

2.2.5 Test à l'annexine V / PI ou 7-AAD

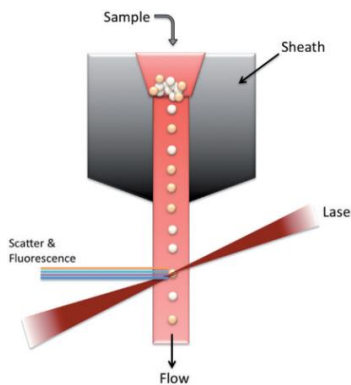
L'annexine V (AnV) est une protéine présentant une forte affinité pour les phosphatidyl-sérines (élément constitutif des membranes cellulaires qui se retrouve à la surface des membranes lors de l'apoptose). Couplée à un marqueur, elle permet de visualiser les cellules en apoptose. L'iodure de propidium (PI) et le 7-AAD (7-amino-actinomycine) sont des agents fluorescents s'intercalant dans l'ADN. Les cellules positives au 7-AAD/PI ont donc perdu leur intégrité membranaire (**Figure 1.62**) (Dorward et al., 2014; Zimmermann et Meyer, 2011).



Adapté de (« Cell Death and Apoptosis », s.d.) (CC)

Figure 1.62 : Principe du marquage à l'annexine V / PI

Après marquage des cellules, la cytométrie en flux permet de dénombrer les cellules en fonction de leurs critères de marquage : AnV-/PI- (cellules vivantes), AnV-/PI+ (nécrose), AnV+/PI- (apoptose précoce), AnV+/PI+ (apoptose tardive)



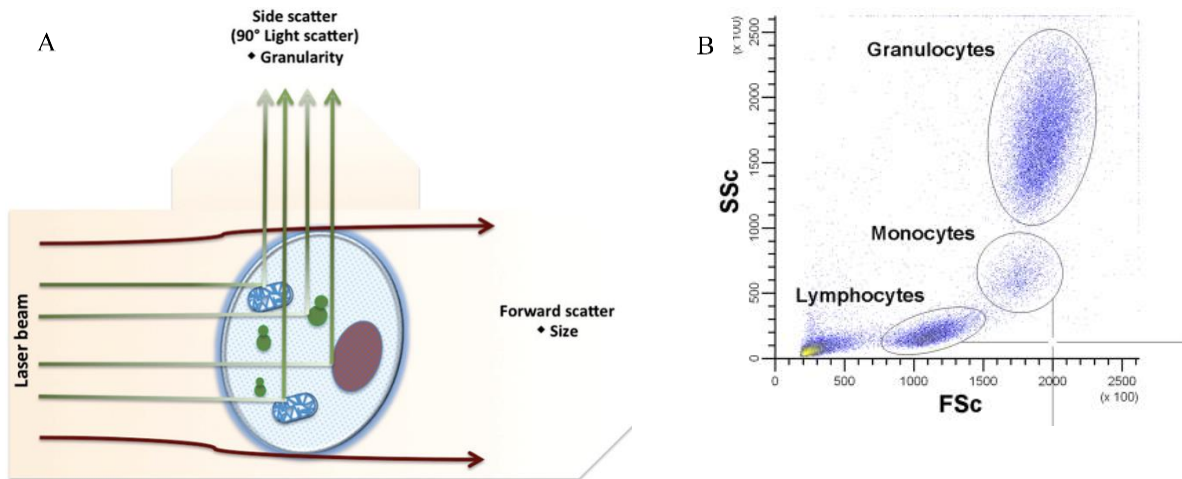
Adaptée de Adan et al. (2017) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.63 : Schéma simplifié du principe de la cytométrie en flux.

La cytométrie de flux est une technologie qui mesure et analyse simultanément plusieurs caractéristiques physiques de particules simples, habituellement des cellules circulant dans un flux fluide à travers un faisceau lumineux (**Figure 1.63**).

La lumière incidente émise par le laser est diffusée en fonction des propriétés physiques des cellules comme la taille relative, la granularité relative ou la complexité interne, et l'intensité relative de fluorescence. Ainsi la lumière diffusée vers l'avant (FSC, *Forward-scattered Light*) est proportionnelle à la surface ou à la taille de la cellule alors que la lumière dispersée latéralement (SSC, *Side-scattered light*) est proportionnelle à

la granularité cellulaire ou à la complexité interne. (**Figure 84-A**) Ainsi, pour une population de cellules sanguines, on obtient le tri illustré dans la **figure 1.64-B** (Adan et al., 2017).

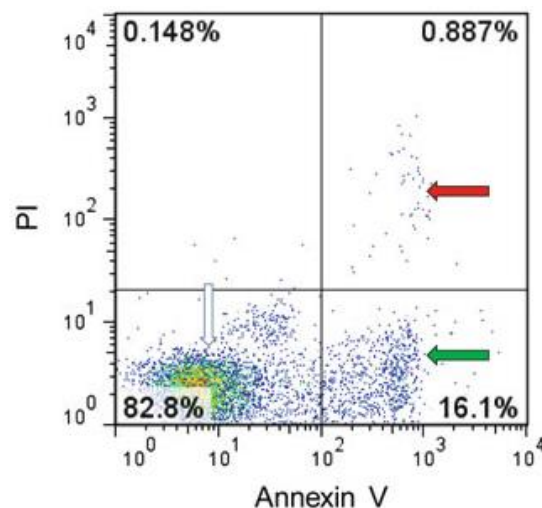


A- Les grandeurs physiques déterminées en cytométrie en flux. **Adaptée Adan et al. (2017) avec permissions de l'éditeur**

B- Distribution des leucocytes du sang en fonction des grandeurs mesurées en cytométrie en flux. **Adaptée de Tadema et al. (2011) (CC)**

Figure 1.64 : Grandeurs physiques déterminées en cytométrie de flux et application aux leucocytes

Le FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) a la capacité de trier et de dénombrer les cellules marquées par fluorescence dans une population de cellules mixtes. Il est donc possible d'évaluer les proportions de cellules présentant un certain type de marquage comme dans le cas de l'utilisation de l'annexine V et du PI ou 7-AAD (**Figure 85**) (Adan et al., 2017).



Adaptée de Dorward et al. (2014) avec permissions de l'éditeur

Figure 1.65: Exemple de résultat obtenu avec la méthode de l'annexine V couplée à l'iodure de propidium.

2.2.6 Exploration des caspases

Les caspases (cystéine protéases) sont des acteurs capitaux de la mort cellulaire programmée. L'activation des caspases peut être analysée par des techniques d'immunofluorescence par immuno-buvardage ("western blott") / ELISA et par cytométrie en flux, en utilisant des anticorps capables de reconnaître à la fois ces enzymes mais également les substrats clivés par les caspases. Ces tests très sensibles sont, pour la plupart, disponibles en kits et évaluent individuellement des caspases effectrices ou une activité globale des caspases (Apo-ONE® homogène caspase-3/7, Pan Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK, ...) (Dorward et al., 2014; Paroni et Brancolini, 2011).

2.2.7 Évaluation du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_M$) est perdu pendant l'apoptose avec la formation de pores qui permettent le passage des protéines des mitochondries dans le cytosol. Les changements dans le potentiel de la membrane mitochondriale des neutrophiles peuvent être mesurés à l'aide de MitoCapture™, un colorant cationique qui s'accumule dans les mitochondries en fonction du potentiel de la membrane. Dans les cellules viables avec un potentiel de membrane mitochondrial intact, MitoCapture™ (de couleur vert) est capable de pénétrer dans les mitochondries, de polymériser et donner une couleur rouge. Cependant, lorsque $\Delta\Psi_M$ est perdu pendant l'apoptose, MitoCapture™ reste sous forme monomère dans le cytosol et "fluoresce" en vert (Dorward et al., 2014).

2.2.8 Électrophorèse de l'ADN

Le clivage de l'ADN par l'endonucléase à des intervalles réguliers sur sa longueur est un événement caractéristique de l'apoptose. Ainsi, les fragments générés produisent des motifs distincts en électrophorèse, contrairement aux fragments produits par des cellules nécrotique mort cellulaire où l'ADN est clivé au hasard (Dorward et al., 2014).

CHAPITRE 5 : OBJECTIFS DE RECHERCHE

La revue de la littérature a permis de constater non seulement une grande diversité dans la nature chimique des métabolites naturels, mais également de mesurer la pluralité de leurs propriétés biologiques. Elle souligne au passage l'attractivité que peuvent susciter les bourgeons qui sont essentiellement composés de jeunes tissus méristématiques à fort potentiels de croissance et de production de métabolites singuliers.

En rappel notre hypothèse de recherche est que les bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge pourraient contenir des molécules bioactives à haute valeur ajoutée pouvant être incorporées dans des phyto-médicaments, des nutraceutiques ou des produits cosmétiques. L'objectif général de cette recherche est donc d'évaluer le potentiel aussi bien chimique que biologique de ces matières végétales à fournir des métabolites bioactifs d'intérêts.

Ainsi, de façon plus précise, nos travaux consisteront :

- (1) à travers une étude comparative d'extraits issus des deux essences, à mettre en évidence et à quantifier des familles chimiques de produits naturels d'intérêt pouvant faire l'objet de valorisation.
- (2) à approfondir les connaissances sur la nature chimique de ces métabolites d'intérêt.
- (3) à mettre en évidence des propriétés biologiques inhérentes aux extraits et /ou molécules d'intérêt issus de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le véritable signe de l'intelligence, ce n'est pas la connaissance mais l'imagination.

Albert Einstein

CHAPITRE 1 : LA MATIÈRE VÉGÉTALE

1. Récolte des bourgeons

Sur la base des études menées par Taylor et Dumbroff (1975) ; Perry et Wu (1960), les bourgeons d'érables dormants ont été récoltés du 10 au 24 mars 2015, lorsque les températures moyennes journalières ne descendaient pas en deçà de -5°C . Cette période pourrait donc correspondre à la phase d'écodormance pour les bourgeons.

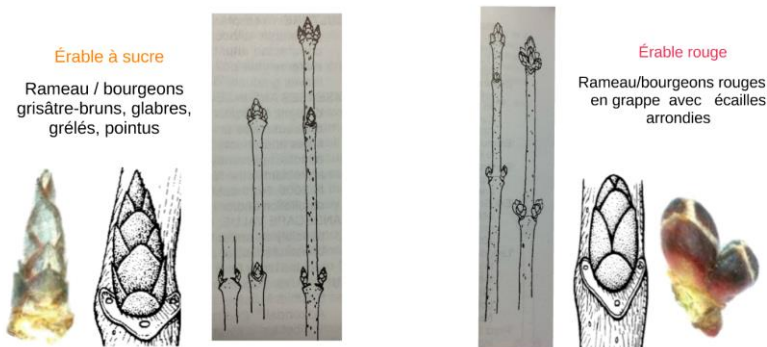
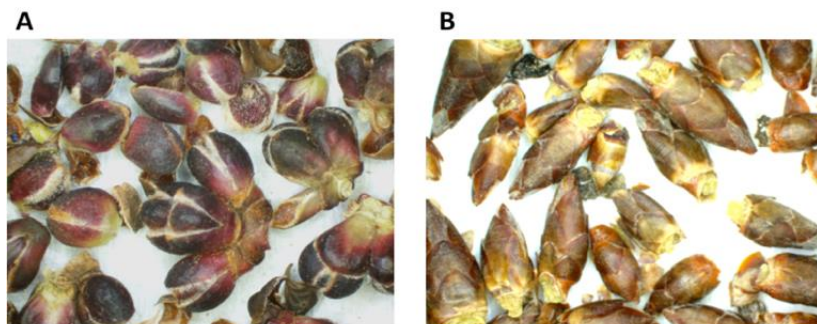


Figure 2.1 : Critère morphologiques d'identification des bourgeons.

Les bourgeons ont été identifiés et récoltés sous la supervision de M. Clermont Levasseur, ingénieur forestier à *Decacer Inc.* (Québec). Les caractères morphologiques clés décrits par Rouleau (1979) ont été utilisés pour confirmer leur identité (**Figure 2.1**). Des spécimens d'érable à sucre (*Acer saccharum*, N° 176) et d'érable rouge (*Acer rubrum*, N° 174) ont été déposés dans l'herbier de la faculté de foresterie de l'Université Laval à Québec, Canada. Deux échantillons de bourgeons ont été recueillis :

- des bourgeons de l'érable à sucre (SMB, *Sugar maple Buds*) récoltés à Dégelis, Québec, Canada. N47°30'36" et W68°34'48",
- des bourgeons de l'érable rouge (RMB, *Red maple Buds*) récoltés à Saint-Antoine-de-Tilly, Québec, Canada. N46°38'42.2" et W71°35'48.4".

Huit arbres vigoureux (par espèce), choisis au hasard ont été utilisés pour récolter les échantillons de bourgeons.



Observations réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire munie d'une caméra ZEISS

Figure 2.2: Les bourgeons récoltés (A- RMB et B- SMB).

Réunies en fagots, les branches ont été livrées au Centre de recherche CRMR et les bourgeons ont été par la suite prélevés manuellement. Afin de s'assurer de la qualité et de l'homogénéité de la matière végétale lors de notre étude, les corps étrangers (brindilles, bout de bois, lichens, mousses végétales etc...) ont ensuite été éliminés pour fournir au final 4500 g de RMB et 950 g de SMB (**Figure 2.2**).

2. Lyophilisation et broyage

Afin de préserver l'intégrité et la qualité des bourgeons récoltés pendant toute la durée de notre étude, ces derniers ont été congelés à -80°C , puis lyophilisés pendant 72 heures. Les échantillons de bourgeons secs ont ensuite été grossièrement et délicatement broyés dans un mortier à l'aide d'un pilon. Cette opération a eu pour but d'éviter toute surchauffe qui pourrait conduire à la dégradation d'éventuels composés thermosensibles contenus dans les bourgeons.

Cela a également permis de rompre l'écaille protectrice des bourgeons afin d'exposer les primordiaux foliaires et les tissus de méristème pour une meilleure diffusion des solvants lors des extractions. La poudre ainsi obtenue pour chaque échantillon est présentée ci-dessous dans la **figure 2.3**.

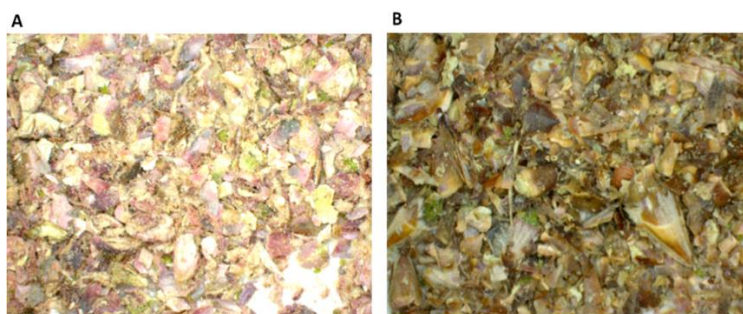


Figure 2.3: Bourgeons d'érables lyophilisés et broyés au mortier (A- RMB et B- SMB)

Après lyophilisation et broyage, les quantités de matière végétales obtenues ont été de 2700 g pour RMB et de 760 g pour SMB. Les échantillons ont été conservés au froid (-20°C) pendant toute la durée de notre étude.

CHAPITRE 2 : EXPLORATIONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

1. Essais physicochimiques sur la matière végétale

1.1 Détermination de la teneur en humidité

Une détermination de la teneur en humidité de la matière végétale lyophilisée a été réalisée sur 3 prises d'essai par échantillon. L'objectif de cette détermination a été de quantifier l'eau résiduelle des bourgeons après la lyophilisation. La teneur en eau a été mesurée selon une adaptation de la norme *US Pharmacopeia Water Determination – 921* (method 3 : *gravimetric determination, procedure for articles of botanical origin*). Elle a consisté à peser directement les échantillons (environ 1g de matière exactement pesée) avant puis après un passage à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures. La teneur en humidité (% H) a été déterminée par l'équation :

$$\% H = 100 \left(\frac{M - M_s}{M} \right)$$

Où M est la masse de matière lyophilisée et Ms la masse de matière après passage à l'étuve.

1.2 Détermination des cendres totales

La détermination des cendres totales dans la matière végétale lyophilisée a également été réalisée sur 3 prises d'essai par échantillons selon la méthode décrite dans la *ASTM Standard E1755-01(2007) - Method of Total Ash determination*. Pour cela, environ 2 g de matière exactement pesés ont été introduits dans un four à moufle pour incinération (8h à 600°C). Le pourcentage des cendres a été déterminé par l'équation :

$$\%C = 100 \left[\frac{M_c}{M(1 - H)} \right]$$

Où Mc est la masse des cendres obtenues après l'incinération, M la masse de matière lyophilisée et H le taux d'humidité en décimale.

2. Exploration chimique des extractibles de bourgeons d'érables

2.1 Extractions

Du fait, du caractère exploratoire de notre étude, la macération, simple du point de vue pratique, a été retenue comme procédé d'extraction des bourgeons. Les échantillons de bourgeons de l'érable (10 g exactement pesés) ont été extraits avec 200 mL de solvant. Les extractions à l'eau ont été réalisées à l'aide d'un bain marie, chauffé à 80°C, sous réfrigérant pendant 1h. Celle utilisant l'éthanol 95% a été réalisée à température ambiante, sous agitation continue (230 rpm) pendant 24h. Pour chaque extraction, nous avons procédé à un épuisement de la matière végétale en renouvelant le même solvant (3 extractions successives réunies par la suite), avec un ratio quantité de matière / volume de solvant de 1/20 constant à chaque fois. Au terme de chaque extraction, une filtration au Büchner à l'aide de papier filtre Whatman N°3 a été effectuée (Diouf et al., 2009).

Les extraits obtenus à partir de l'éthanol 95% ont complètement été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif

à 40°C sous vide alors que ceux issus de l'extraction à l'eau chaude ont d'abord été concentrés par le même procédé puis lyophilisés. Les rendements des extractions ont ensuite été exprimés en pourcentage par rapport à la quantité de matière végétale initiale.

$$\%Rdt = 100 \left[\frac{Me}{M(1-H)} \right]$$

Où Me est la masse de l'extrait après l'élimination du solvant, M la masse de matière lyophilisée et H le taux d'humidité en décimale.

2.2 Exploration qualitative des métabolites extraits des bourgeons d'érables

Les extraits obtenus ont ensuite subi un criblage chimique par chromatographie sur couche mince couplée à la détection par dérivation post-chromatographique. Ceci a permis de mettre en évidence les principales familles de métabolites, et de fournir une empreinte chimique pour chacun des extraits.

Largement utilisé et optimal pour la séparation d'un large éventail de structures chimiques, le gel de silice avec un indicateur de phosphorescence intégré dans le revêtement (FLEX TLC SILICA 60 F₂₅₄) a été retenu pour notre étude. Des plaques de 15 x 15 cm ont été découpées puis activées par chauffage à l'étuve pendant 15 min. 10 µL de chaque traitement (20 mg / mL) ont été appliqués sur la plaque à l'aide d'une micro-seringue à 10 mm du bord inférieur de la plaque, sur une bande de 15 mm, avec des espacements de 10 mm entre les échantillons. Les plaques de CCM ont ensuite été éluées sur une distance de 120 mm, dans une chambre de migration pré-saturée avec 50 ml de l'un des systèmes de phases mobiles présentés dans le **tableau 2.1**.

Tableau 2.1: Composition des phases mobiles utilisées pour la migration sur plaques de CCM (H. Wagner, 1996)

Système	Composition	Pouvoir d'éluion
I	<i>n</i> -Butanol : acide acétique: méthanol (6:3:1)	fort
II	Acétate d'éthyle: acide acétique: méthanol (10:1:1)	moyen
III	Dichlorométhane: méthanol (8:2)	faible

Après séchage à l'air libre, les plaques de CCM ont été systématiquement observées sous UV à 254 nm puis 366 nm. Des révélateurs ont ensuite été appliqués pour mieux observer les spots de composés séparés. La liste des réactifs de dérivation et des composés ciblés dans les extraits de bourgeons d'érables est présentée dans le **tableau 2.2**.

Tableau 2.2: Nature des réactifs de dérivation utilisés pour le criblage chimique des extraits de bourgeons d'érables.

Réactifs de dérivation	Familles chimiques ciblées	Sources
Réactif à la vanilline sulfurique	Terpénoïdes, Stéroïdes, Saponosides, Sucre, Phénols	(Cieśla et Kowalska, 2013; Marston, 2011; H. Wagner, 1996; Wall, 2005d)
Réactif de Dragendorff's	Hétérocyclique basique et alcaloïdes	
Réactif à la ninhydrine	Amines / Acides Aminés / peptides/ protéines	
Réactif de Wagner	Composés dérivés de la purine (cytokinines, caféine)	
Réactif à l'orcinol	Glycosides (polysaccharides, glycoprotéines et glycolipides)	
Réactif de Bornträger	Coumarines / Quinones et dérivée	
Réactif de Neu	Acides phénols, Flavonoïdes	

Certains réactifs comme la vanilline sont des réactifs universels car ils sont utilisés pour visualiser des composés portant des fonctions différentes. A l'inverse d'autres permettent la mise en évidence de groupe fonctionnels plus spécifiques (par exemple des amines, des alcools comportant des aldéhydes, des cétones, les acides...).

2.3 Explorations quantitatives des métabolites présents dans les extraits des bourgeons

2.3.1 Estimation des protéines

Les protéines contenues dans les extraits de bourgeons d'érable ont été estimées par la méthode de combustion de l'azote à haute température décrits par Rhee (2001). Sous forme de capsule en boule, environ 20 mg d'extraits ont été introduits dans l'analyseur (*PerkinElmer Nitrogen Analyser 2410 serie II*) où se réalise une combustion à 600 °C qui dégage l'azote des échantillons sous forme de gaz. L'azote est ensuite quantifié par un détecteur à conductibilité thermique et ce pourcentage est converti en équivalent protéines par un facteur de correction pour la biomasse végétale: % protéines = %N x 6,25 soit %N x 62,5 (expression en mg/g d'extrait sec).

2.3.2 Évaluation des sucres totaux

Les sucres totaux contenus dans les bourgeons d'érable ont été quantifiés par une adaptation de la méthode de Phénol – Acide sulfurique décrite par Albalasmeh, Berhe, et Ghezzehei (2013). Un volume de 4 mL d'essai à 50 µg/mL ont été mélangés à 1 mL de réactif phénol (solution aqueuse à 5% m/m). Après agitation, 5 mL d'acide sulfurique concentré ont ensuite été rajoutés au mélange et l'ensemble a d'abord été placé à l'obscurité pendant 10 min puis dans un bain d'eau à température ambiante pendant 20 min. Enfin, l'absorbance des solutions a été mesurée à 490 nm contre un blanc comportant de l'eau distillée à la place de l'essai.

La teneur en sucres totaux a été exprimée en mg de Galactose Rhamnose Arabinose Fructose Equivalent par gramme d'extrait sec (mg de GRAFE/g). Ces monosaccharides sont les intermédiaires les plus souvent

rencontrés après l'hydrolyse acide d'oligosaccharides provenant d'extraits végétaux (Chow et Landhäusser, 2004). Pour cela, une solution constituée du mélange stœchiométrique (1 :1 :1 :1) de ces 4 sucres a été utilisée comme standard, dans les conditions identiques à celle des essais.

2.3.3 *Évaluation des composés phénoliques*

2.3.3.1 Dosage des polyphénols totaux

La méthode utilisée dans notre cas est une variante de la méthode décrite par Scalbert, Monties, et Janin (1989). Un volume de 0,5 mL de solution d'essai à 50 µg/mL a été associé à 2,5 mL de réactif de Folin (dilué au dixième) et 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L). Le mélange a été porté à 50 °C dans un bain-marie (10 min), puis dans un bain de glace (10 min). Après le retour à la température ambiante, l'absorbance de la solution a été mesurée à 760 nm contre un blanc (essai remplacé par de l'eau distillée).

La teneur en polyphénols dans les extraits a été exprimée en mg d'acide gallique équivalent par gramme d'extrait sec (mg GAE/g). Une courbe de calibration utilisant ce standard a donc été réalisée selon le même protocole.

2.3.3.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes ont été dosés en utilisant du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) selon la méthode décrite par Brighente et al. (2007). Deux (2) mL de AlCl₃ (2% dans le méthanol) ont été rajoutés à 2 mL d'essai à 1 mg / mL puis incubés à 20 °C pendant 1h. L'absorbance des essais a été déterminée à 415 nm contre un blanc ne contenant pas de réactif.

La teneur en flavonoïdes a été exprimée par rapport à la quercétine équivalent (mg QE / g d'extrait sec), utilisé comme standard de calibration dans les mêmes conditions.

2.3.3.3 Dosages des acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques totaux ont été évalués par la méthode décrite par St-Pierre, Achim, et Stevanovic (2013). Le dosage a été réalisé en ajoutant à 0,5 mL de la solution d'essai (1 mg/mL) à 1 mL d'acide chlorhydrique, 1 mL de réactif d'Arnou, 1 mL de soude et 1,5 mL d'eau. Après agitation, l'absorbance du mélange a été mesurée à 525 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée à la place du réactif d'Arnou. La teneur en acides hydroxycinnamiques totaux a été exprimée par rapport à l'acide chlorogénique (mg CAE/g) utilisé comme standard de calibration dans les mêmes conditions.

2.3.3.4 Dosages des flavanols et proanthocyanidols

Pour le dosage des proanthocyanidols, la méthode utilisant le p-diméthylaminocinnamaldehyde (DMACA) décrite par Wallace et Giusti (2010) a été utilisée avec quelques modifications. Nos tests ont consisté à diluer 20 µL de solution d'essai (1 mg/mL) dans du méthanol (2380 µL) puis à rajouter 100 µL de réactif de DMACA, préparé à 2 % (m/v) dans une solution d'acide sulfurique à 6 N dans du méthanol. Le mélange a été incubé à

température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 30 min. Les absorbances ont ensuite été enregistrées à 640 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place du réactif de DMACA.

Les résultats de ce dosage ont été exprimés en fonction de la (+) catéchine (mg CE/g d'extrait sec) utilisée comme référence de calibration dans les mêmes conditions.

2.3.3.5 Dosages des Anthocyanes

Les anthocyanes contenus dans les bourgeons d'érable ont été analysés en utilisant la méthode de détermination des monomères d'anthocyanes totaux décrit par Lee, Durst, et Wrolstad (2005) et basée sur le différentiel de pH.

Des solutions d'essai à 25 mg / mL ont été diluées au dixième parallèlement dans une solution tampon d'acide chlorhydrique / chlorure de potassium (pH 1,0) et dans une solution tampon d'acétate de sodium / acide acétique (pH 4,5). Quinze minutes après les dilutions, une détermination de l'absorbance des essais dilués avec les différentes solutions tampon (pH 1,0 et pH 4,5) a été effectuée à la fois à 520 et à 700 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée. La valeur de l'absorbance de chaque essai a ensuite été calculée selon l'équation :

$$\text{Abs} = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}.$$

Le contenu en anthocyane de chaque échantillon a été exprimé en fonction de la cyanidin-3-glucoside (mg de C3GE / 100 g d'extrait sec) traité dans les mêmes conditions.

2.3.4 *Évaluation des saponosides*

Dans de nombreuses pharmacopées (chinoise, française, européenne et américaine), la confirmation de la présence d'hétérosides de triterpènes ou de stéroïdes dans des extraits de plantes médicinales passe obligatoirement par des tests spécifiques de mousse ou d'hémolyse des érythrocytes (Tang et Eisenbrand, 2013).

2.3.4.1 Test de mousse

Les propriétés détergentes (capacité à former de la mousse) des potentiels saponosides d'extraits de bourgeons d'érable ont été mises en évidence par une adaptation du test de mousse décrits par Kareru et al. (2007). Les extraits aqueux et éthanoliques de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge ont été introduits à 10 mg/mL dans des tubes à essai et agité vigoureusement pendant une minute (1 min). L'observation de mousse formée et sa persistance pendant au moins 15 min confirment la présence de saponines.

2.3.4.1 Test d'hémolyse

La capacité hémolytique des potentiels saponosides d'extraits de bourgeons d'érable a été démontré par des tests sur gélose décrits par Almutairi et Ali (2015). En résumé, 70 µL d'extraits de bourgeons d'érables à 50 mg/mL ont été déposés sur des géloses de tryptone Soya contenant du sang de mouton. Un extrait de *Quillaja saponin* (contrôle positif de référence utilisé par la pharmacopée européenne) à la même concentration et de

l'eau stérile (témoin négatif) ont été soigneusement distribués dans les puits. Les plaques de gélose au sang ont ensuite été observées après 24 heures à température ambiante.

2.4 Séparation, de purification et de caractérisation des composés.

2.4.1 Analyses en HPLC

2.4.1.1 HPLC-DAD

Afin de caractériser les composés phénoliques contenus dans les extraits de bourgeons d'érable, une analyse par HPLC a été effectuée en utilisant la chromatographie liquide analytique en phase inverse. Un appareil de HPLC de marque *Agilent 1100 series* équipé d'un injecteur automatique et couplé à un détecteur à barrette de diodes (DAD) de même marque a été utilisé.

Les séparations ont été effectuées sur une colonne Zorbax® C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phénomenex) placée dans une enceinte thermostatée à 30°C. Un gradient binaire a été utilisé pour nos analyses. La phase A était constituée d'acide formique (5%, v/v) dans l'eau. La phase B se composait quant à elle d'un mélange volumique d'acétonitrile, de méthanol et d'eau (90 :5 :5). Les analyses ont été réalisées avec un débit de 0,7 mL/min avec le gradient suivant: 0 - 5 min (0% de B), 5 - 25 min (0 - 6% B), 25 - 30 min (5 - 8% B), 30 - 45 min (8 - 10 % B), 45 - 50 min (10 - 15% de B), 50 - 90 min (15 - 30% B), 90 -95 min ((30 - 50% B), 95 - 105 min (50% de B), 105 - 106 min (50-0% de B) et de 106 - 110 min (0% de B).

Après injection de 10 µL d'échantillon (20 mg/mL pour SMB contre 2,5 mg/mL pour RMB), les chromatogrammes ont été enregistrés à des longueurs d'ondes d'absorption maximale spécifiques de certaines classes de polyphénols, à savoir 280 nm (dérivés d'acides hydroxybenzoïques, flavanols et leurs dimères), 320 nm (dérivés d'acides hydroxycinnamiques), 350 nm (dérivés de flavonols) et 520 nm (anthocyanes). Les données spectrales de tous les pics ont été accumulées dans la gamme 200-600 nm.

2.4.1.2 HPLC couplé à la spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS, *High Resolution Mass Spectrometry*) a été réalisée sur une série à temps de vol (TOF) 6210 connectée à l'HPLC. La source d'ionisation était un *électrospray* (ESI, *Electrospray Ionization*) et les analyses ont été réalisées aussi bien en mode positif qu'en mode négatif. Les spectres de masse enregistrés dans la gamme de m/z 100 – 1000 ont ensuite été traités avec le logiciel Mass Hunter pour calculer les formules brutes.

2.4.1.3 Quantification par HPLC

Les composés phénoliques ont été quantifiés par HPLC en utilisant des courbes d'étalonnage obtenues pour chaque composé identifié dans une gamme de concentration appropriée. Pour les composés dont les standards n'étaient pas disponibles, les concentrations ont été exprimées en équivalent de composé ayant la structure la plus similaire. Basé sur l'écart-type de la réponse du détecteur (r) et la pente (S) des courbes de calibration, les

limites de détection (LOD, *Limits of detection*) et les limites de quantification (LOQ, *Limits of quantification*) ont été déterminés pour chaque composés comme suit: LOD = 3,3r / S et LOQ = 10r / S.

2.4.3 Purification des composés phénoliques et analyse RMN

L'extrait lyophilisé de RMB (50 g) a été mis en suspension dans de l'eau distillée et soumis à une partition liquide / liquide successive avec des solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol). Ceci a permis d'obtenir 0,2 g de fraction dichlorométhane, 16,8 g de fraction pour l'acétate d'éthyle (EAF, *Ethyle Acetate Fraction*), 12 g pour la fraction butanol (BF, *Butanol Fraction*) et une fraction aqueuse restante de 17,9 g (RWF, *Remaining Water Fraction*).

Une partie de EAF (4 g) a été déposée sur du gel de silice en chromatographie ouverte. La colonne a d'abord été éluée avec du dichlorométhane, puis avec un mélange de dichlorométhane : méthanol dans les proportions 9: 1, 8: 2, 6: 4, 4: 6 et 2: 8 pour finir avec 100% de méthanol. Douze fractions ont été obtenues. Les fractions 5, 6 et 7 ont été mélangées (1,2 g) et appliquées à une colonne de gel Sephadex LH 20 éluée avec un mélange eau : méthanol (9 : 1 à 0 : 1) pour donner cinq sous-fractions majeures (A - E). La sous-fraction B (202 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative en utilisant 1% d'acide formique dans l'eau (A) et du méthanol (B), selon le gradient 0-25 min (5-20% B) pour donner les composés **2** (*Acide gallique*, 12 mg), **5** (*3,6-di- O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol*, 25 mg), et **6** (*Maplexine D*, 5 mg). Les fractions C (53 mg) et D (76 mg) ont été soumises à une HPLC semi-préparative en utilisant de l'eau (A) et un mélange méthanol / acétonitrile (3 : 1) (B), en gradient d'éluion (0 - 5 min, 40% B, puis 5 - 15 min, 40 - 60% B), pour obtenir les composés **13** (*Hyperoside*, 18 mg), **14** (*Isoquercétine*, 7 mg), **16** (*Guaijaverine*, 10 mg) et **17** (*Quercétine*, 3 mg).

La fraction BF a été dissoute dans de l'eau et chargée sur une résine Amberlite XAD 7-HP en chromatographie ouverte. La colonne a été rincée avec de l'eau distillée (Fr. BX-1) puis éluée avec une proportion croissante de méthanol, 25% (Fr. BX-2A), 50% (Fr. BX-2B) et 100% (Fr. BX-2C). Ces trois sous-fractions de BX-2 ont été appliquées consécutivement sur Sephadex LH-20 (élué avec un mélange eau : méthanol de 1: 0 à 0: 1). Certaines fractions ont été purifiées sur HPLC semi-préparative en utilisant 1% de HCOOH dans de l'eau (A) et du méthanol (B) en utilisant le gradient 0 - 25 min (5 - 20% B) et 0 - 20 min (20 - 40% B), pour donner les composés **3** (*Ginnaline B*, 14 mg), **4** (*Ginnaline C*, 30 mg), **7** (*Chrysanthemine*, 4 mg), et **8** (*Ginnaline A*, 125 mg).

Une partie de la fraction restante soluble dans l'eau (5 g) a été soumise à une résine Amberlite XAD 7HP CC lavée avec H₂O (AX-1), et les composés phénoliques ont été désorbés avec du MeOH (AX-2). Cette sous-fraction a été appliquée à séphadex LH-20 CC (éluée avec H₂O / MeOH de 1: 0 à 0: 1) pour donner quatre autres principales fractions. Le premier a été encore purifié séquentiellement par HPLC semi-préparative en utilisant 1% de HCOOH dans de l'eau (A) et du méthanol (B), 0-25 min (5-20% de B), pour donner le composé **1** (*Maplexine A*, 6 mg) et le composé **12** (*Acide ellagique*, 3 mg).

La chromatographie liquide haute performance semi-préparative utilisée pour les purifications était un *Agilent Infinity 1260* équipée d'une colonne *Zorbax SB-C18* (250 mm, 21,2 mm, 7 µm) à un débit de 10 mL/min.

L'acquisition des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D (^1H - et ^{13}C) et 2D-RMN (^1H - ^1H , COSY, HSQC, HMBC) a été réalisée sur un spectromètre DD2 d'Agilent Technologies. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du progiciel Mnova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espagne).

3. Exploration d'activité antioxydante d'extraits d'érables

3.1 Mesures de la capacité anti-radicalaire

Des concentrations comprises entre 0,1 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extrait de RMB et de SMB ont été utilisées pour explorer leur capacité à piéger des radicaux. Le Trolox (analogue soluble de la vitamine E) et l'Oligopin[®] (extrait d'écorce de pin maritime normalisé commercialisé en France) ont été utilisés comme contrôles positifs aux mêmes concentrations pour comparaison. Les radicaux libres DPPH[•] et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) ont été utilisés et les pourcentages de capacité de piégeage des radicaux (RSC, Radical Scavenging Capacity) ont été calculés en utilisant l'équation :

$$\% \text{ RSC} = [(A_{\text{Control}} - (A_{\text{Essai}} - A_{\text{Extrait}})) / A_{\text{control}}] \times 100$$

dans laquelle A_{control} est l'absorbance mesurée pour le mélange sans extrait. A_{Essai} est l'absorbance du mélange avec l'extrait et A_{Extrait} est l'absorbance de l'extrait.

Les courbes de réponse du RSC en fonction du logarithme des concentrations ont été tracées et les concentrations efficaces nécessaires pour réduire la concentration en radicaux de 50%, CE_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été calculées par régression linéaire.

3.1.1 Test au DPPH[•]

L'activité de piégeage du DPPH[•] radical a été dosée selon le protocole décrit par Li, Henry, et Seeram (2009) avec des modifications mineures. Brièvement, le test a été mené dans une microplaque de 96 puits en utilisant 100 μL d'échantillon et 150 μL de solution de DPPH[•] (70 mg / L). Les absorbances ont été mesurées à 516 nm après 30 min.

3.1.2 Test d'anion superoxyde.

Le test a été effectué selon le protocole décrit par Royer et al. (2013). Brièvement, 1 mL d'une solution de NTB (100 μM dans du tampon phosphate, pH 7,4) a été mélangé à 1 mL de solution de NAD (468 μM dans du tampon phosphate, pH 7,4) et 1 ml d'échantillon. La réaction a ensuite été déclenchée en ajoutant 100 μL d'une solution de PMS (60 μM toujours dans du tampon phosphate, pH 7,4) et le mélange a été incubé à 30 ° C pendant 15 min. L'absorbance a été mesurée à 560 nm contre un blanc (solution tampon phosphate).

3.2 Mesure de la capacité antioxydante par le test ORAC

La capacité des extraits issus de bourgeons d'érable à ralentir l'oxydation d'une molécule cible (fluorescéine) en présence d'un radical peroxyde (AAPH) a été évaluée par le test ORAC en utilisant la méthode adaptée de Prior, Wu, et Schaich (2005). Brièvement, 20 μL d'échantillons et 200 μL de solution de fluorescéine (0,036

mg/L) ont été transférés dans une microplaque de 96 puits. Après 20 min d'incubation à 37 ° C, 75 µL de solution de AAPH (8,6 mg/L) ont été ajoutés et la fluorescence a été immédiatement lue aux longueurs d'onde d'émission de 520 nm et d'excitation de 485 à l'aide d'un *Fluostar Galaxy*. La perte de fluorescence a été suivie toutes les minutes pendant 2 h, avec 8 s d'agitation avant chaque mesure. Le blanc a été préparé en utilisant du méthanol à la place de l'échantillon. Une gamme de concentrations de Trolox (standard positif de référence) a été utilisée dans les mêmes conditions, pour exprimer les valeurs ORAC_{FL} des extraits de bourgeons en termes de micromoles d'équivalent Trolox par gramme d'extrait sec (µmol T.Eq. /g extrait sec).

4. Exploration de l'effet d'extraits et /ou de molécules sur la viabilité des neutrophiles

L'effet des extraits sur la viabilité des neutrophiles humains a été étudié par cytométrie en flux en utilisant l'Annexine V-FITC et l'iodure de propidium (AnV / PI) comme marqueurs. Les neutrophiles ont été obtenus à partir du sang veineux de volontaires sains, recueilli fraîchement dans des tubes de citrate (anticoagulant). Les prélèvements ont été réalisés selon les directives du comité d'éthique de la recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec et conformément à la déclaration d'Helsinki.

4.1 Purification des neutrophiles

L'isolement des neutrophiles a été réalisé comme décrit par Chakravarti et al. (2009) avec de légères modifications. Brièvement, les plaquettes étaient d'abord éliminées du sang total par centrifugation. Ensuite, la sédimentation différentielle en utilisant la méthode standard de dextran à 2% a permis d'éliminer les érythrocytes. Les granulocytes ont enfin été séparés des monocytes et lymphocytes par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Le culot de neutrophiles récupéré au fond a été débarrassé des érythrocytes contaminant par une lyse dans une solution hypotonique. Après lavage, les neutrophiles ont été comptés et remis en suspension à 10 x 10⁶ cellules/mL dans du RPMI 1640 supplémenté avec 1% de FBS, de l'HEPES à 10 mM et des antibiotiques (100 U / mL de pénicilline et 100 U / mL de streptomycine).

4.2 Essais de viabilité cellulaire

Un volume de la suspension de neutrophiles (100 µL) a été traité avec des concentrations croissantes en extrait (RMB et SMB), fractions (EAF, BF, RWF) et molécules pures issues d'extraits d'érable et incubé pendant 24 h à 37 ° C dans une atmosphère de 5% de CO₂. À la fin du traitement, les cellules ont été recueillies et lavées avec une solution de tampon phosphate. Remises en suspension dans 100 µL de tampon de liaison, 2 µL de AnV ont été rajoutés et le mélange a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après cette période, 400 µL de tampon de liaison à froid ont été ajoutés et 2,5 µL d'une solution de PI (50 ug/mL) ont été introduits dans le mélange. Après encore 15 minutes d'incubation dans l'obscurité les cellules ont été analysées par cytométrie en flux de type FACS *Calibur* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) et les données de 10 000 événements ont été enregistrées. Les pourcentages correspondants aux cellules viables An V (-) / PI (-); aux neutrophiles en apoptose précoce (An V (+) / PI (-)) et tardif (An V (+) / PI (+)) ainsi que les cellules nécrotiques (An V (-) / PI (+)) ont été exprimés pour chaque traitement et comparés au contrôle (véhicule utilisé pour dissoudre les échantillons).

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

"Le plus timide bourgeon est la preuve qu'il n'y a pas de mort réelle."

William Blake Mcedwards

Peintre, poète, 1757 - 1827

RÉSULTATS 1 : UNE MATIÈRE VÉGÉTALE CONFORME AUX NORMES DES PHARMACOPÉES

Les résultats des essais physicochimiques réalisés sur les bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge sont présentés dans le **tableau 3.1**

Tableau 3.1 : Résultats des essais physicochimiques sur la matière végétale.

Échantillons	Taux H. (%)	Cendres (%)
RMB	3,53 ± 0,03	3,22 ± 0,12
SMB	2,43 ± 0,01	5,78 ± 0,21

Les valeurs ci-dessus sont des moyennes ± écarts types de 3 mesures. RMB (bourgeons d'érable rouge) and SMB (bourgeons d'érable à sucre)

Les teneurs moyennes en humidité des échantillons de bourgeons sont donc de 3,53 % ± 0,03 pour l'érable rouge et de 2,43 % ± 0,01 pour l'érable à sucre. La teneur en humidité est un indice de qualité pour la préservation car le séchage est la méthode de conservation la plus couramment utilisée pour la matière végétale. En effet, la conservation à des teneurs en humidité trop élevées expose la matière à des actions enzymatiques et à des proliférations de micro-organismes (bactéries et moisissures) pouvant conduire à la dégradation des constituants végétaux. Dans les monographies de drogues végétales de la pharmacopée européenne (6ème édition), les *essais de perte à la dessiccation* (2.2.32) mentionnent des teneurs en eau appropriées maximales de 8 à 12% (Elena, 2012). Les résultats obtenus pour nos essais sur tous les échantillons de bourgeons de l'érable sont donc satisfaisants. Les échantillons de bourgeons de l'érable ont été séchés par lyophilisation. Cette méthode présente de nombreux avantages (grande efficacité et préservation des composés thermosensibles). Cependant, il s'agit de la méthode la plus complexe et la plus coûteuse dont les applications sont généralement limitées aux matériaux délicats et sensibles à la chaleur (Oniszczyk et Hawry, 2010). L'influence d'autres méthodes de séchage sur la nature des composés présents dans les bourgeons d'érables et leur efficacité à réduire la teneur en eau de la matière pourraient être évaluées lors d'études ultérieures.

Les teneurs moyennes en cendres totales sont de 3,22% ± 0,12 et de 5,78% ± 0,21 respectivement, pour les échantillons de bourgeons de l'érable rouge et ceux d'érable à sucre. Les cendres totales représentent la quantité de matières inorganiques présentes naturellement dans la matière végétale. Elles se composent généralement de carbonates, de phosphates, de chlorures et de sulfates de sodium, calcium, potassium et de fer, mais également de silice et de silicates qui sont potentiellement des impuretés (provenant du sable). Des normes en cendres totales ont été établies pour un grand nombre de matière végétale. Habituellement, ces normes deviennent une limite maximale permise. Dans la plupart des pharmacopées une valeur limite est définie pour chaque monographie et peut varier de 0,1 à 20 % en fonction de la nature de la matière végétale. En général, cette valeur limite se situe entre 5 et 7% (Pedersen, 2006). Les résultats obtenus sur tous les échantillons de bourgeons de l'érable sont donc acceptables. En plus des cendres totales, une méthode de détermination des

cendres insolubles dans l'acide (sulfurique ou chlorhydrique) et une caractérisation de la composition des cendres totales sont souvent associées à ces tests de matières inorganiques. Ces différents tests pourront également être envisagés lors de prochaines explorations.

RÉSULTATS 2 : UNE DIVERSITÉ DE PRODUITS NATURELS D'INTÉRÊT DANS LES EXTRAITS DE BOURGEONS D'ÉRABLE

1. Contexte / Transition

La valorisation d'extraits issus de bourgeons d'érable passe avant tout par une connaissance des familles de composés naturels pouvant être récupérés dans les solvants utilisés. Les bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge n'ayant jamais fait l'objet d'études chimiques proprement dit, nous rapportons dans ce chapitre les résultats de l'exploration chimique qui a permis d'évaluer le potentiel de ces matières végétales à fournir des composés d'intérêts pour divers applications.

2. Résumé

Les extractibles de bourgeons d'érable à sucre (SMB) et d'érable rouge (RMB) ont été obtenus à partir d'eau chaude et de d'éthanol 95 % (v/v). La nature des familles de composés naturels qui s'y trouvaient a été révélée grâce à un criblage chimique utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) associée à divers révélateurs.

Sur la base des couleurs et des positions des spots obtenus lors du criblage chimique par CCM, il apparaît que les deux essences présentent les mêmes familles de composés naturels majoritaires aussi bien pour les extraits à l'eau chaude que pour les extraits hydroalcooliques. Au vu de l'intensité des « *spots* » obtenus, il semblerait que les extractibles de SMB seraient plus riches en dérivés d'acides aminés et dérivés glucidiques tandis que ceux de RMB semblent contenir bien plus de composés phénoliques. L'application d'outils de chimiométrie pour l'analyse des empreintes chimiques de ces extraits en ce qui concerne leurs contenus en composés phénoliques a permis d'obtenir de rigoureux résultats présents dans l'article 1.

La plaque positive au réactif de NEU a d'abord été photographiée. L'image obtenue a ensuite été traitée en utilisant le programme *ImageJ* (version 1.50a) pour générer des chromatogrammes qui ont par la suite été comparés par une analyse en composante principale (ACP). Cette approche a révélé que des composés phénoliques avec un faible facteur de rétention (R_f inférieur à 0,3) étaient caractéristiques des extraits d'érable à sucre. A l'inverse, ceux exprimant de fortes intensités lumineuses pour des R_f entre 0,3 et 0,8 étaient distinctifs des extraits d'érable rouge. Enfin, cette analyse a confirmé que la nature du solvant utilisé pour les extractions semble également avoir un effet sur les composés phénoliques extraits des bourgeons d'érable et cet effet devra être évalué par le biais de méthodes quantitatives.

L'ensemble des observations suggère potentiellement des différences cruciales dans la nature chimique des extractibles de SMB et RMB. Qu'elles soient qualitatives et/ou quantitatives, ces différences mériteraient d'être explorées et caractérisées au travers de méthodes chromatographiques plus performantes et d'approches quantitatives.

3. Nature chimique des composés présents dans les extraits de bourgeons d'érable.

Pour le criblage des principales familles chimiques contenues dans les extraits à l'eau chaude et à l'éthanol 95% de bourgeons d'érable, nous avons opté pour la chromatographie sur couche mince couplée à des dérivations par des révélateurs. Cette technique de criblage présente l'avantage de fournir également une empreinte chimique des échantillons testés, qui servira de marque d'identité et de contrôle de qualité. Il s'agit de la méthode utilisée en première approche dans l'investigation de la composition chimique pour l'édification de monographies dans la plupart des pharmacopées (Skalicka-Woniak, Gowniak et Widelski, 2008).

Les résultats du screening chimique réalisés sur les extraits à l'eau chaude et à l'éthanol de RMB et SMB sont rapportés dans le **tableau 3.2**.

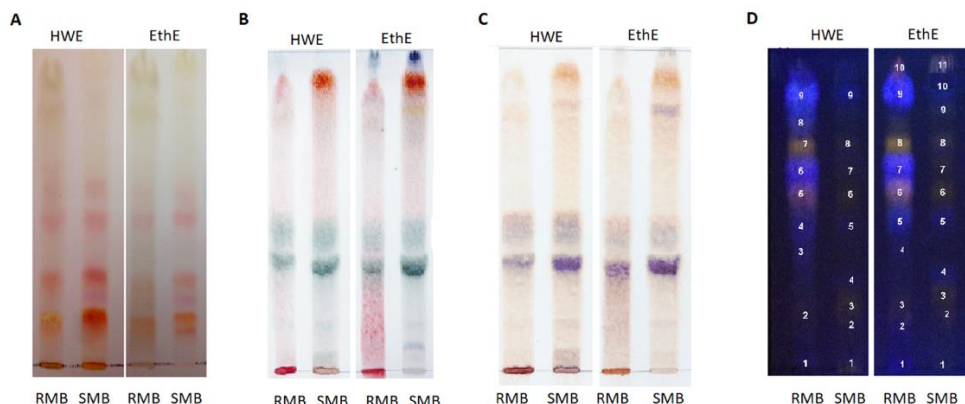
Tableau 3.2 : Résultats du criblage chimique par CCM des extraits de bourgeons d'érable

Révélateursw	Natures des composés ciblés	Résultats	
		RMB	SMB
Réactifs de Dragendorff's	Hétérocyclique basique et alcaloïdes	-	-
Réactif de Wagner	Composés dérivés de la purine	-	-
Réactif à la ninhydrine	Acides Aminés / peptides/ protéines : Orange et violet –pourpre	+	++
Réactif à la vanilline sulfurique	Divers composés incluant des phénols, des saponosides, des polysaccharides, et des terpénoïdes qui apparaissent vert, bleu-violet ou jaunâtre	+	++
Réactif à l'orcinol	Polysaccharides et glycolipides : violet et/ou bleu Sucrose : rouge brun	+	++
Réactif de Bornträger	Coumarines, Anthracène, Quinones et dérivés	-	-
Réactif de Neu (exposition 365 nm)	Acides phénols : lumière fluorescente bleue ou violet Flavonoïdes : jaune-orange, jaune-vert,	+++	+

Les résultats indiquent que pour les familles de composés naturels recherchées, les deux essences se sont avérées contenir les mêmes familles majoritaires, à savoir :

- des dérivés azotés différents des alcaloïdes, qui seraient des acides aminés, des peptides et/ou des protéines
- des composés naturels réagissant positivement au réactif à la vanilline pouvant être de diverses natures, qui compte tenu des solvants utilisés pour l'extraction pourraient être des composés phénoliques, des saponosides (hétérosides de triterpènes ou de stéroïdes) ou des polysaccharides,
- des glycosides (oligo- et/ou polysaccharides, glycoprotéines et glycolipides),
- et des composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénols d'après les couleurs des spots obtenus)

Les empreintes chimiques des échantillons pour ces familles de composés naturels sont présentées dans la **figure 3.1** ci-dessous.



Les extraits aqueux (HWE, Hot Water Extract) et éthanoliques (EthE, Ethanol 95 extract) de bourgeons d'érable rouge (RMB) et d'érable à sucre (SMB) ont été déposés sur une plaque de silica gel 60 F₂₅₄ puis élués avec des mélanges. Un mélange n-butanol, d'acide acétique et de méthanol (6 :3 :1) a été utilisé pour A-C et un mélange d'acétate d'éthyle, d'acide acétique et de méthanol (10:1 :1) pour D. Puis les plaques de CCM ont été révélées au réactif de ninhydrine (A), de vanilline/acide sulfurique (B), d'orcinol (C) et de Neu. Les plaques A-C sont observées à la lumière du jour alors que la plaque D est photographiée sous excitation à 365 nm.

Figure 3.1: Résultats du criblage chimique des principales familles de composés naturels présents dans les extraits de bourgeons d'érable.

Une observation rapide de ces empreintes semble indiquer que la nature du solvant utilisé pour les extractions a surtout un effet sur la quantité des métabolites obtenus dans les extraits que sur la nature même de ces composés (couleurs et positions des spots quasi identiques)

3.1 Potentiellement des acides aminés atypiques dans les extraits

Les études de chimiotaxonomie (distribution des familles de métabolites au sein des taxons) réalisées par Wink et al. (2010) ont montré la présence d'alcaloïdes de type benzyl-isoquinoline dans l'ordre des sapindales. Par contre, ces composés semblent cependant se retrouver à la famille des rutacées car aucun alcaloïde au sens strict n'a déjà été caractérisé au sein des sapindacées. Ainsi, les acides aminés, peptides et/ou protéines mis en évidence par un test positif à la ninhydrine (**Figure 3.1-A**) pourraient constituer l'unique source en azote dans les extraits de bourgeons d'érable. Wink et al. (2010) révèlent qu'à l'image de certaines fabacées, certaines espèces de la famille des sapindacées peuvent présenter des acides aminés non protéiques. En rappel, il s'agit de produits naturels qui peuvent interférer avec la biosynthèse des protéines donnant lieu très souvent à des structures non fonctionnelles. Ils peuvent, ainsi donc, s'avérer toxiques pour les microorganismes (bactéries et champignons), les animaux (prédateurs, insectes) mais aussi pour l'homme.

Du fait de l'importance chimiotaxonomique de la présence d'acides aminés non protéiques dans des espèces du genre *Acer* et face à la nécessité de prouver l'innocuité des extraits de bourgeons d'érable, des études supplémentaires devront être menées pour caractériser ces composés azotés.

3.2 Potentiellement des saponosides et /ou de polysaccharides dans les extraits

Le réactif à la vanilline sulfurique est un révélateur non spécifique largement utilisé dans la mise en évidence de composés organiques dont les terpénoïdes, les saponosides, les composés phénoliques et les

polysaccharides. Son utilisation pour le criblage chimique a permis de mettre en évidence potentiellement la présence de ces composés dans les extraits de bourgeons d'érables (**Figure 3.1-B**). D'après Wagner (1996), les terpénoïdes (stéroïdes y compris) et les saponosides réagissent avec la vanilline en présence d'acide sulfurique pour donner des "spots" de couleur vert, bleu, bleu violet, rouge ou jaune brun. Les terpénoïdes sont des composés apolaires, donc plutôt solubles dans des solvants organiques type dichlorométhane et hexane. La présence de ce type de composés dans des solvants polaires (eau et éthanol) nécessite la présence de nombreux résidus osidiques. D'où l'hypothèse d'une présence de saponosides dans les extraits de bourgeons d'érable, surtout pour les échantillons d'érable à sucre. Aussi, l'examen de la plaque positive au réactif d'orcinol (**Figure 3.1-C**) montre une similitude avec les spots précédemment décrits. Ce réactif met en évidence des glycosides de différentes natures. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle, ces composés majoritairement observés dans l'extrait de SMB porteraient probablement d'importants groupements glucidiques.

En rappel, le genre *Acer* appartient à la famille des sapindacées selon la classification phylogénétique APG III - 2009. Le nom de cette famille dérive du latin *sapindus* (sapo + india = savon d'inde) qui caractérise les propriétés tensio-actives des composés contenus dans la plupart des espèces de cette famille. Ces composés, à savoir les saponosides, représentent un marqueur de chimiotaxonomie dans la famille des sapindacées (Umadevi et Daniel, 1991; Wink et al., 2010). Aussi, des saponosides de type glycosides triterpéniques ont été mis en évidence dans des espèces du genre *Acer* (*Acer negundo*, *Acer velutinum*) confirmant ainsi potentiellement la présence de ces composés dans le genre (Glen'sk et al., 2009; Kupchan et Takasugi, 1970; Vermeersch et al., 2009). Les saponosides ont retenu de nombreuses attentions dans le domaine des cosmétiques, du fait de leurs propriétés détergentes. Ces composés présentent également des propriétés pharmacologiques et biologiques: hémolytiques, antifongiques et antibactériennes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices (Bruneton, 2009). Des essais supplémentaires, tels que des tests hémolytiques préconisés par la pharmacopée européenne, devront être réalisés pour confirmer la présence de saponosides dans les extraits de bourgeons d'érable.

Des glycolipides (Santori, 1981; Smith, Axelos et Péaud-Lenoël, 1976), des glycoprotéines (Barr et Nordin, 1980) et même des polysaccharides (Adams, 1961; Haq et Adams, 1961; Mian et Timell, 1960; Scott et Hay, 1967; Sun, Ma, Seeram et Rowley, 2016) déjà décrits dans des érables pourraient être également envisagés pour ces composés fortement présents dans les extraits d'érable à sucre. En rappel, les polysaccharides sont les biopolymères les plus abondants de la nature et participent à de nombreux processus biologiques. En fonction de leur origine et de leur nature chimique, les polysaccharides, principalement de sources naturelles sont largement utilisés pour leurs propriétés multifonctionnelles. En effet, on les retrouve dans de nombreuses applications industrielles notamment dans le domaine pharmaceutique, de la nutrition et de l'agroalimentaire, des biomatériaux etc. Ainsi les fibres alimentaires qui regroupent une grande part de polysaccharides non digérés (cellulose, hémicellulose, pectine, inuline) modulent la digestion, l'absorption des nutriments (glucose, lipides). De nombreuses études épidémiologiques suggèrent que l'apport de fibres dans l'alimentation pourrait prévenir l'apparition de nombreuses maladies cardiovasculaires (AVC, hypertension), métaboliques (diabète, hypercholestérolémie, obésité) et même des cancers gastro-intestinaux (Liu, Willför et Xu, 2015). D'autres polysaccharides comme les β -glucanes présentent de nombreuses propriétés:

immunomodulatrices, anti-tumorales ; antithrombogènes, anticoagulants, antioxydants, hypolipémiants, radioprotecteurs et antidiabétiques (Santa et *al.*, 2015). Leurs propriétés physicochimiques font qu'ils sont également prisés dans les formulations où ils apportent de la texture, améliorent la stabilité et les propriétés sensorielles des produits (Campos, Melo et Junior, 2014). Parce qu'ils réduisent la perte d'eau transépidermique, les polysaccharides sont utilisés en cosmétique comme actifs hydratants dans de nombreuses préparations (Kanlayavattanakul et Lourith, 2015).

Considérant ainsi l'importance de tels dérivés osidiques pour le bien-être et la santé humaine, des études complémentaires devront être réalisées afin de connaître la nature de ces composés mis en évidence dans les extraits des deux espèces.

3.3 Une grande diversité de composés phénoliques dans les extraits

L'utilisation du réactif de Neu comme révélateur a permis de mettre en évidence une forte présence de composés phénoliques de type flavonoïdes et acides phénols surtout dans les extraits de bourgeons de l'érable rouge (**Figure 3.1-D**). En effet, un aperçu des empreintes chimiques des traitements semble indiquer des différences majeures et flagrantes entre deux espèces d'érable, notamment en ce qui concerne l'intensité des "spots".

De nombreux composés phénoliques ont été caractérisés dans la sève, l'écorce, le bois et les feuilles d'érable à sucre et d'érable rouge. Les études chimiotauxonomiques réalisées précédemment révèlent que des anthocyanes (S. B. Ji et *al.*, 1992a), des tanins (hydrolysables et condensés) (Bate-Smith, 1977, 1978), ainsi que des acides phénols et flavonoïdes (Umadevi et Daniel, 1991) sont très souvent rencontrés dans les espèces du genre *Acer*. Comme indiqué précédemment dans l'introduction sur la chimie des érables, les connaissances sur les composés phénoliques de ces deux essences laissent apparaître pour les tissus déjà étudiés des différences majeures. Ces différences semblent déjà s'exprimer dans les organes contenant les tissus embryonnaires comme les bourgeons.

La caractérisation de ces composés phénoliques apporterait des connaissances supplémentaires sur l'évolution de ce type de composés, des tissus embryonnaires vers les tissus spécialisés de la plante comme l'écorce ou les feuilles. Aussi, les composés phénoliques ont toujours suscité un grand engouement dans plusieurs domaines allant de la santé humaine à l'agroalimentaire. En effet, en plus d'être des colorants naturels pour la plupart, ces composés présentent très souvent des propriétés biologiques intéressantes. Par exemple, leurs effets bénéfiques sur la santé humaine sont souvent attribués à leurs activités antioxydantes qui traduisent leur capacité de piégeage des espèces oxygénées réactives (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Ces composés offriraient ainsi une protection contre la survenue de maladies cardiovasculaires, de cancers, de maladies métaboliques et neuro-dégénératives qui ont toutes en partie pour points communs, les effets biologiques de ces ROS et le processus d'inflammatoire chronique. Compte tenu de leur diversité et de l'intérêt qu'ils peuvent présenter, les composés phénoliques des bourgeons d'érables mériteraient donc d'être explorés.

4. Article 1

Chemometrics-based approach to analysis of phenolic fingerprints of red and sugar maple bud extracts.

Published at Austin Biochemistry 2017; 2(1): 1009

by:

Meda NR^{1,2,3}, Rott M^{1,2}, Suwal S^{1,2}, Poubelle PE³ and Stevanovic T^{1,2,*}

Affiliation :

¹ Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR), Département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval, Québec City, Canada.

² Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec City, Canada.

³ Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du CHU de Québec, Département de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

* Corresponding author at: Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, 2425 rue de la Terrasse, Pavillon G-H Kruger, Québec, QC, G1V 0A6 Canada. Tel.: +1 418 6562131 x 7337; fax: +1 418 656 2091.

E-mail address: tatjana.stevanovic@sbf.ulaval.ca

4.1 Abstract

We are reporting here the results of the first study on phenolic constituents of hot water and aqueous ethanol extracts of sugar (*Acer saccharum* Marsh) and red maple (*Acer rubrum* L.) buds. The bud extracts were compared for their phenolic fingerprints using thin layer chromatography (TLC) supported by chemometric tools. The NP/PEG (Natural products/polyethylene glycol) derivatized TLC plate was photographed using a digital camera. The image of each plate was subsequently processed using the ImageJ program (1.50a version). The global analysis of TLC tracks showed major differences in colors, intensities, and positions of spots on the phenolic fingerprint of the extracts of buds from red and sugar maple. The chemometric approach revealed that phenolic compounds with lower retention factor (Rf) were revealed for sugar maple extracts, while those exhibiting bright intensity spots at Rf between 0.3 and 0.8 were observed for red maple extracts, thus indicating to the differences between their phenolic fingerprints. The solvent used for extraction seems also to have an effect on the phenolic compounds extracted from maple buds. The results of the principal component analysis suggest that there are significant differences in the phenolic fingerprints between the bud extracts of sugar and red maple which are related to both the species and the solvent applied for extraction. The obtained results demonstrate the interest to apply TLC as an efficient method in screening of phytochemicals, especially in combination with new informatics and statistical tools.

Keywords

Acer saccharum, *Acer rubrum*, Buds, Phenolic constituents, Principal Component Analysis, TLC fingerprinting.

List of abbreviation:

TLC: Thin layer chromatography,

Rf: retention factor,

NP/PEG: Natural products/polyethylene glycol reagent,

PCA: Principal component analysis

RM: red maple

SM: sugar maple

HPTLC: High Performant Thin Layer Chromatographic

HPLC: High Performant Liquid Chromatographic

4.2 Introduction

Chemometrics is a branch of science that derives data by the application of mathematical and statistical methods for the extraction of useful information from physical and chemical phenomena (Singh et al., 2013). Principal component analysis (PCA) is probably the most widespread multivariate chemometric technique employed to visualize and summarize large amount of data obtained from multivariate measurements in chemistry (N. Kumar, Bansal, Sarma et Rawal, 2014). It reduces the dimensionality of the data by producing new linear combinations of the original variables while retaining the most significant information. Despite of their significant contribution in the analysis of phytochemicals, there is still the lack in their comprehensive use in many applications (Gemperline, 2006; Komsta, 2012).

Phenolic compounds are secondary metabolites, widely distributed in the plant kingdom (Abdi, Safarian, Esmaeili et Ebrahimzadeh, 2011). The interest in these substances was stimulated by their wide range of biological properties including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial etc (Sankhalkar et Vernekar, 2016). Also, the low incidence of several chronic diseases such as cardiovascular disease, diabetes, and cancer have been revealed to be in relationship with the intake of foods rich in polyphenols. So, plant polyphenolic compounds are becoming increasingly interesting for nutritionists as well as food and cosmetic industry professionals (Royer et al., 2011).

Sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) and red maple (*Acer rubrum* L.), two important species of Northeastern American forests are notorious for their sap, which is used for maple syrup production. Traditional and anecdotal medicinal claims for other parts of these plants in Amerindian medicine has also incited the interest to study different maple tissues. Previous phytochemical studies have reported gallotannins, procyanidins, lignans, coumarins, and flavonoids in leaves, bark and wood of the red maple and sugar maple species (González-Sarriás, Li, et al., 2012; Wan, Yuan, Li, et al., 2012; Yuan et al., 2011, 2012). Up to now, one only study dealing about the involvement of phenolic compounds in the dormancy breaking of sugar maple bud have been reported (Thakur, 1977). However, buds contain mass of meristems that are undifferentiated embryonic tissues where regrowth of new tissues takes place after winter dormancy. (Horvath, 2010) Bud extracts are also a category of plant products well known and widely used for gemmotherapy but also in homeopathy and in phytotherapy (Ieri, Innocenti, Possieri, Gallori et Mulinacci, 2015). Tree buds are generally rich in plant growth hormones, microelements, vitamins, enzymes, free amino acids, polyphenols, nucleic acids and other bioactive compounds that are often found only in trace amounts in differentiated part of plants (Donno, Beccaro, Cerutti, Mellano et Bounous, 2015).

To the best of our knowledge this is the first study comparing phenolic fingerprints of water and ethanol extracts from sugar and red maple buds. So, the ability of these green solvent, to pick up significant and various phenolic compounds were assessment by semi-quantitative analysis using thin layer chromatography (TLC) supported by chemometric tools.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Chemicals

95 % ethanol was purchased from Commercial Alcohols Inc. (ON, Canada). Methanol, ethyl acetate, acetic acid were ACS certified and purchased from Fisher Scientific Chemicals, (Fair Lawn, NJ, USA). Kollisolv[®] PEG E 400 and 2-Aminoethyldiphenylborate for NP/PEG staining were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.3.2 Plant materials

The dormant buds from SM and RM were harvested at the end of winter, from 10 to 24 March 2015. Voucher specimens (*Acer saccharum* Marsh, No. 176 and *Acer rubrum* L., No. 174) have been deposited at the herbarium of the Faculty of forestry, geomatics and geography (Faculté de foresterie géographie et géomatique) at Université Laval, Quebec City, Canada. The key morphological criteria described by Rouleau (1979) were used to confirm their identities. Maple buds were collected from eight randomly selected vigorous trees (per species), pooled and mixed well before freeze-drying. Dried bud samples were then carefully crushed in a mortar to avoid the overheating and the powders were kept at -20°C until extraction.

4.3.3 Extraction procedure

Maple buds (10 g) were extracted with 200 ml of solvent. The extraction with water was carried out using a water bath heated at 80 °C under reflux conditions for 1 hour. The extraction with ethanol (95%) was performed by continuous shaking (230 rpm) at room temperature, for 24 h with an orbital shaker. The extracts were separated by filtration through Whatman No. 3 filter paper (Whatman International Ltd., UK) in a Buchner funnel. Recovered solvent (ethanol) was evaporated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator (Rotavapor[®] model R-215) until dryness, while aqueous extracts were firstly pre-concentrated under vacuum evaporator using same conditions and then freeze-dried.

4.3.4 Explorative analysis of phenolic fingerprints of maple bud extracts

4.3.4.1 TLC fingerprint processing

To provide a chemical fingerprint for each of the extracts studied, these were separated by TLC following by NP/PEG (Natural products/polyethylene glycol reagent) post-chromatographic derivation. Analysis was performed on 20 cm X 20 cm flex TLC plates pre-coated with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). Then (10) µL of each extract (20 mg/mL) was deposited on the plate using a micro-syringe, at 10 mm from the bottom edge, for 15 mm wide bands, and spacing of 10 mm between the samples. TLC plates were then eluted for a distance of 120 mm in a pre-saturated chamber, by using 50 mL of mobile phase that consists of solvents mixtures; ethyl acetate: acetic acid: methanol in the ratio of 10/1/1 (v/v/v). After development, the plates were air-dried for 10 min and the spots were firstly visualized at daylight, and under UV light, at 254 and 366 nm

without any derivatization. Phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) were then brought out by using NP/PEG derivatization reagents.

4.3.4.2 Fingerprint analysis of phenolic content using chemometric tools

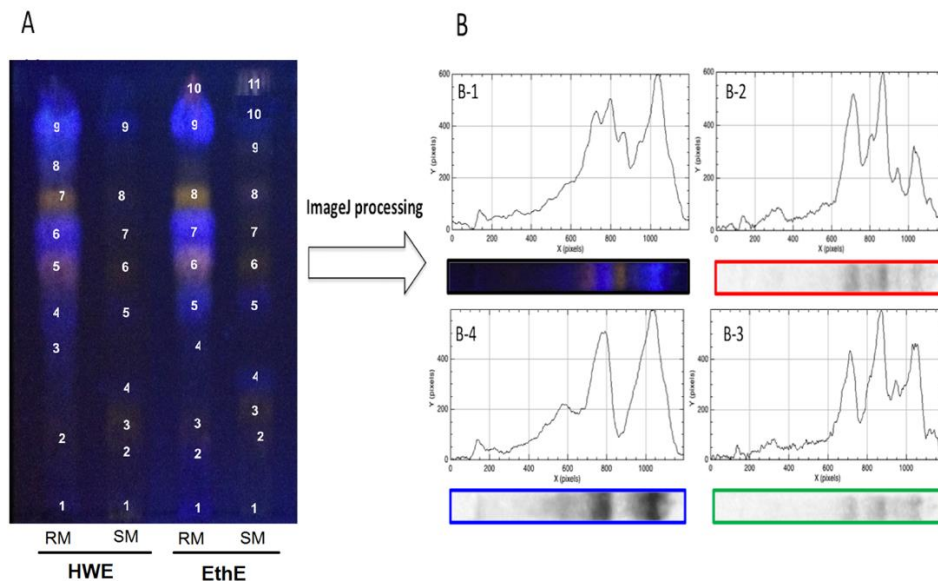
Chemometric tools were used to explore the phenolic compounds present in maple bud extracts by TLC fingerprinting according to a variant of the process described by Ristivojević et al., (2014). The NP/PEG post-derivatized TLC plate was photographed using a digital camera (Canon PowerShot ELPH 13015). The image of the plate was subsequently processed with the ImageJ program (1.50a version), a public domain Java-based image-processing program developed at the United States National Institute of Health. The image (1200 x 1500 pixels) was split into three filter channels: red, green, and blue, which are primary color components (*Image/Colors/Split channels*). Each filter channel was then de-noised by applying the median filter function (*Process/Filters/Median/Radius – 5 pixels*) and subtracting background (*Process/Subtract background .../Rolling ball radius – 50 pixels*). At last, in order to change the images of tracks into chromatograms, a rectangular selection tool was used to outline the tracks (1200 x 125pixel) and the line profile plots were achieved with plot profile option (*Analyse /Plot Profile/ Selected*) for each track according to the filter channel. The profile plot displays in two-dimensional graph, the intensities of pixels (y-axis) by distance along the line.

A chromatogram (600 variables) was used as a dataset for chemometric analysis. Principal component analysis (PCA) was applied on the matrix resulted from the digitized chromatograms (4 samples × 600 variables) for each channel separately, in order to explore the fingerprints data by extracting important information and by finding out the main sources of variability. The analysis was performed with SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.4. Results and discussion

The thin layer chromatography (TLC) following by NP/PEG reagent (*Diphenylborinic Acid 2-aminoethyl Ester/ polyethylene glycol*) was used to highlight phenolic components in the maple bud extracts. This reagent reacts especially with flavonoids and phenolic acids through their phenolic hydroxyl groups to give a fluorescence quenching compound under UV radiation lamp at 366 nm (Brasseur et Angenot, 1986).

Visual examination of the image capturing the TLC chromatograms (**Fig. 3.2-A**) revealed differences in phenolic chemical composition between the maple bud extracts. First, it appeared that ethanolic extract provided more spots on their tracks for all samples (10 spots for RM and 11 spots for SM) than hot water extracts (9 spots for each sample track). But the blatant remark of these fingerprints was the brighter intensity of spots for the extracts of red maple buds (RM) compared to those of the sugar maple (SM). These findings suggest a higher concentration of phenolic compounds in the extract of red maple buds. The global analysis of tracks showed differences in colors, intensities, and positions of spots that reflect a significant difference in the chemicals fingerprint of these samples. The subjectivity of the TLC analysis by visual examination could be counterbalanced by chemometric tools for the fingerprints analysis (Komsta, 2012).



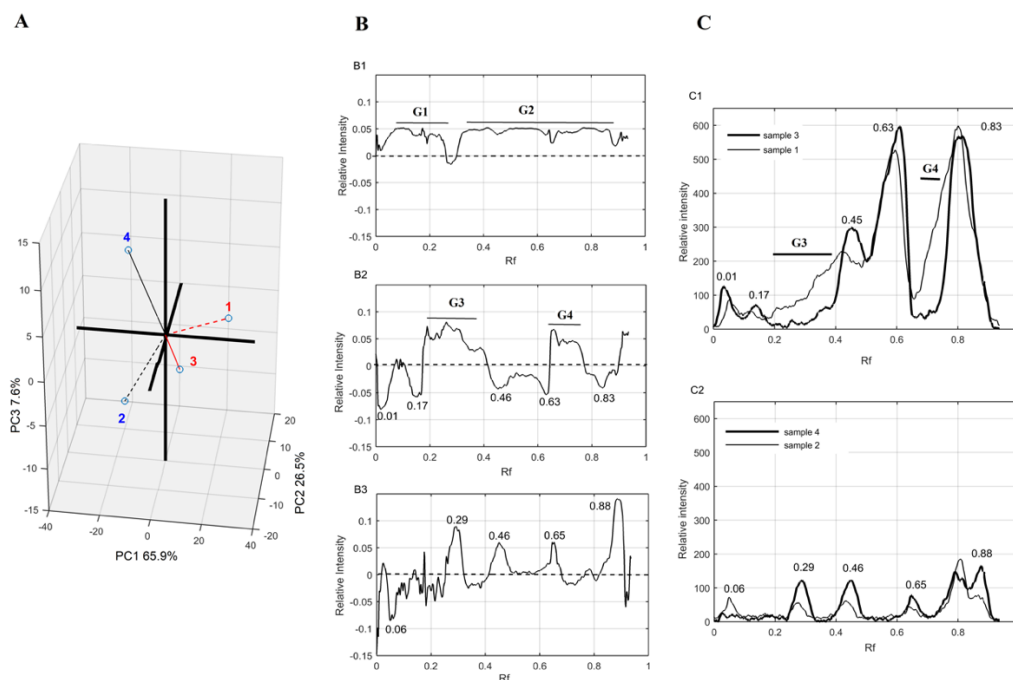
A - TLC fingerprint of phenolic compounds presents in maples bud samples. Hot water Extract (HWE) and Ethanol Extract (EthE) of red maple (RM) and sugar maple (SM). Post derivatization were then performed with NP reagent (visualized at UV 366 nm for plate). **B** - ImageJ processing used to generate in two dimensions graph, the chromatographic plot of hot water extract of red maple buds (B-1) according Red (B-2), Green (B-3) and Blue (B-4) channels.

Figure 3.2: TLC fingerprinting of extracts from red and sugar maple buds.

The chemometric techniques allow to compare and explore complex and multivariate data to recover the best information in order to find the relationship between the samples and variables in a given dataset (N. Kumar et al., 2014). Despite of their significant contribution in the analysis of phytochemicals, there is still a lack of their comprehensive use in many applications (Gemperline, 2006; Komsta, 2012).

The image of the TLC plate was therefore processed by ImageJ software to generate the line profile plots of chromatograms for each track in order to perform full chemometric processing analysis. Red (R), green (G), and blue (B) filter channels were applied to improve the selectivity by differentiating compounds (spots) according to their fluorescence colors (**Fig. 3.3-B**). The variables (corresponding to the relative retention factor along each migration track) of each of the samples digitized chromatograms were subjected to the most often used unsupervised method, namely the principal component analysis (PCA).

PCA is a powerful tool for identifying patterns in high dimensional data and for emphasizing differences and similarities among studied samples. To do that, it condenses the main sources of the data's variability by producing new linear combinations of the original variables, called principal components (PCs), while retaining the large and most significant proportion of information. Called scores plot, the graphical representation of samples in the reduced space composed by these new PCs (often in two or three dimensional) provides useful information from the data set and contributes to its better visualization (Brereton, 2003; Ren, Hinzman, Kang, Szczesniak et Lu, 2015).



A- Scatter plot of the three principal components (PC) extracted from PCA analysis according to blue channel filters.
 B- Loadings plot for the PC1 (B-1), PC2 (B-2) and PC3 (B-3) for blue channel filters; Rf (Retention factor), G character followed by number appoint group of TLC spots.
 C- The line profile plots of chromatograms of maple bud extracts.

Figure 3.3: Chemometric analysis of phenolic fingerprint of extracts from red and sugar maple buds.

The explorative analysis revealed that, even if for each filter channel, the first three principal components (PCs) regroup all sources of variability (Scree Plot of each channel in complementary data), the blue channel filter favors easier viewing of differences between sugar and red maple bud samples. Based on the coordinates of the samples principal component (PC), three dimensional (3D) visualizations of the distribution relative to each other were generated to describe the optimal view of their differences. This 3D scatter plot of the PCA is shown in **Fig. 3.3-A** in which the dotted lines represent samples arranged behind the plane while solid lines display samples placed inside or ahead of the plane. The most important component (PC1) represented up to 65.9 % of the total variance clearly allowed to differentiate the red maple bud extracts (samples 1 and 3 for hot water and ethanol extraction, respectively, that display positive coordinates on this PC 1) from all the sugar maple bud extracts. These findings suggest a real interesting way of discriminating between the phenolic constituents of bud extracts from two maple species. The second component PC 2 with 26.5 % of the total variance allowed to discriminate samples from hot water and ethanol extraction, for red maple buds. The last component PC 3 distinguished sample 2 to sample 4 that were respectively, the hot water extract and the ethanol extract of sugar maple buds.

The loading plots according to each component were displayed in order to identify variables (the Rf values of each compound/spot on TLC plate) that contributed to the greatest variation among different samples tested (**Fig. 3.3-B**). So, for PC1 (**Fig. 3.3-B1**), two groups of TLC spots seemed to have most contribution to the discrimination between the samples. The first group (G1) contains spots having a retention factor (Rf) lower

than 0.3 whereas the second group (G2) represents the spots with a Rf between 0.3 and 0.8. Visual examination of the TLC plate further confirmed that it could be separated into two parts: the first part that gathers compounds with low Rf, seems to be more important in sugar maple bud extracts, thus would correspond to the G1. The second part of the TLC plate, which could be so far, the most obvious variation assimilated to the brightest intensity spots of red maple bud extracts that fits to the G2. In sum, phenolic compounds with lower Rf values determined in sugar maple bud extracts and those having Rf values between 0.3 and 0.8, characterized by bright intensity spots, in red maple bud extracts, could have strongly contributed to the differences observed between the TLC fingerprints of the two species studied.

The loading plot for PC2 (**Fig.3.3 -B2**) revealed that spots with Rf values of 0.01, 0.15, 0.26 (G3), 0.46, 0.63, 0.70 (G4) and 0.83 have the most impact on this PC that discriminates the hot water and ethanol extract fingerprints for red maple buds. In a similar way TLC bands with Rf values of 0.06, 0.29, 0.46, 0.65 and 0.88 appear to be responsible for the differences observed for fingerprint of sugar maple bud extracts related to the extraction solvent (**Fig. 3.3-B3**). By close examination of the line profile plots of chromatograms for these samples for blue filter (**Fig. 3.3-C**), it appears that the variables exposed by chemometric analysis, are really at the root of the observed differences of the phenolic fingerprints of samples.

Fingerprinting analysis of complex mixtures such as plant extracts have often been performed by HPTLC (High Performant Thin Layer Chromatographic) or HPLC (High Performant Liquid Chromatographic) system that provides unparalleled performance in chemical separations comparatively to TLC (Zheleva-Dimitrova, Balabanova, Gevrenova, Doichinova et Vitkova, 2015). However, careful spotting of samples could lead to conclusive results for chemometric analysis by TLC. The results obtained in this research indicate that despite the low capacity of separation compared to the more advanced analytical chromatographic techniques, TLC displays advantages to be easy, fast, inexpensive, and allowing screening of a large range of phytochemicals. Furthermore, under optimum separation conditions, this screening technique provides a chemical fingerprint of a sample, while providing the first approach to the investigation of the chemical composition of plants for the edification of monographs in most pharmacopoeia (Skalicka-Woniak et al., 2008). Based on the results of this study, the use of chemometric tools gave a powerful and successful contribution to the analysis of the fingerprints of maple buds extracts. Because of their contribution to the authentication of the sugar and red maple bud extracts, the compounds revealed by our study will have to be further identified as chemical markers of these extracts and species they originate from.

4.5 Conclusion

We are presenting for the first time, the results on the comparison of the phenolic fingerprint of hot water and ethanol extractions of sugar and red maple buds. The TLC fingerprint analyses revealed that sugar and red maple bud extracts displayed considerable differences. Phenolic compounds with lower retention factor (Rf) point out in to the sugar maple samples and those characterized by bright intensity spots at Rf between 0.3 and 0.8 for red maple sample could strongly contribute to differentiate of these species. Also, solvent used for extraction seems to have an effect on the phenolic content of extracts from maple buds. Quantitative assays on

the phenolic constituents and the assessment of the antioxidant capacity of these bud extracts, which make a part of the ongoing research, might confirm the interest of the maple bud extracts and/or their active ingredients.

4.6 Conflict of interest and Acknowledgments

The authors declare no conflicts of interest.

The authors are grateful for the financial support from the Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) and the Décacer and Levaco Inc. The authors are grateful to Mr. Clermont Levasseur from Decacer Inc. for his personal involvement during sampling of maple buds. We would like to thank Mr. Yves Bédard, Sara Hattab and Alex Simard for technical assistance, and Mme Helène Crépeau for statistical model validation.

5. Contributions majeures à l'amélioration des connaissances

1- Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois, que des extraits aqueux et éthanoliques de bourgeons d'érable à sure et d'érable rouge pourraient contenir les mêmes familles de composés naturels en ce qui concerne leurs constituants majoritaires. Il s'agirait potentiellement de dérivés d'acides aminés, de dérivés glucidiques et de composés phénoliques.

2-Nos résultats suggèrent également que les teneurs en ces métabolites varient en fonction des espèces étudiées et que le solvant d'extraction semble avoir une influence. L'évaluation des quantités de ces différents métabolites et leur caractérisation chimique permettrait d'envisager diverses voies de valorisation pour ces extraits de produits naturels.

3-En ce qui concerne la méthode utilisée, notre étude a prouvé une fois de plus que la CCM reste une méthode semi-quantitative adaptée pour les criblages en phytochimie, particulièrement lorsqu'elle est associée aux nouveaux outils informatiques et statistiques.

RÉSULTATS 3 : LES TENEURS EN METABOLITES D'INTÉRÊT SUGGÈRENT DES POTENTIELS DE VALORISATION DIFFÉRENTS POUR LES EXTRACTIBLES DE BOURGEONS DE CES DEUX ESSENCES

1. Contexte / Transition

Afin d'apprécier le potentiel de valorisation d'extraits issus de bourgeons d'érable, il est primordial de connaître leurs teneurs en différents métabolites d'intérêt précédemment mis en évidence. C'est donc dans ce cadre que nous avons procédé à une évaluation des rendements en extraits secs de bourgeon d'érable et à la détermination de leurs concentrations en composés phénoliques, en dérivés d'acides aminés et glucidiques.

2. Résumé

Divers métabolites d'intérêt ont été mis en évidence dans des extraits aqueux de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge. Afin d'évaluer le potentiel de valorisation de ces familles de composés naturels, une estimation de leurs teneurs dans les extraits de bourgeons d'érable a été réalisée par le biais de dosages spectrophotométriques.

Les résultats indiquent déjà qu'en ce qui concerne les rendements en extraits secs, les bourgeons d'érable rouge (RMB) fournissent quel que soit le solvant utilisé pour les extractions, bien plus d'extractibles que les bourgeons d'érable à sucre (SMB). Aussi, pour les deux essences, la quantité en extractibles obtenue à partir de l'eau chaude s'est montrée toujours supérieure à celle obtenue avec l'éthanol 95% (v/v).

Les essais quantitatifs menés sur les extraits ont montré que ceux de RMB présentent d'importantes teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et anthocyanes, complètement corrélées à une forte capacité antioxydante au DPPH*. Les extraits de SMB quant à eux, sont plus fournis en dérivés d'acides aminés et glucidiques, mais également pour des sous-classes d'acides hydroxycinnamiques et de proanthocyanidines corrélées à une activité antioxydante au test ORAC. Ces différences majeures dans les teneurs en famille de composés naturels laissent entrevoir des voies de valorisation potentiellement différentes pour les extraits provenant des bourgeons de ces deux espèces.

Les résultats confirment également l'effet de la nature du solvant sur la quantité en métabolites obtenue pour la plupart des familles de phytoconstituants. Lors d'une valorisation future de bourgeons de l'érable à sucre ou de l'érable rouge, ces données constitueront un réel pouvoir de décision quant à la nature du solvant à utiliser pour mieux cibler les composés d'intérêt.

3. Article 2

Investigation of extracts from red and sugar maple buds as potential source of antioxidant phytochemicals.

Published at Current Topics in Phytochemistry 2016, Vol. 13, Pages 69 – 78

by:

N. R. Meda^{1,2,3}, S. Suwal^{1,2}, M. Rott^{1,2}, P. E. Poubelle³ T. Stevanovic^{1,2,*}

Affiliation :

¹ Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRM), Département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval, Québec City, Canada. ² Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec City, Canada. ³ Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du CHU de Québec, Département de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

* Corresponding author at: Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, 2425 rue de la Terrasse, Pavillon G-H Kruger, Québec, QC, G1V 0A6 Canada.
Tel.: +1 418 6562131x7337; fax: +1 418 656 2091.
E-mail address: tatjana.stevanovic@sbf.ulaval.ca

3.1 Abstract

We report here for the first time, the results on the phenolic composition analysis of hot water and ethanol extracts of buds from sugar (*Acer saccharum*) and red maple (*Acer rubrum*), two dominant species of Laurentian forest of Quebec. The aim of the present study is to demonstrate the antioxidant capacity of these extracts while revealing their phenolic constituents. The extraction yields were determined for two types of buds based on the solvent used. Spectrometric methods were applied to quantify total phenols and different classes of polyphenols while the antioxidant capacity of the extracts was studied *in vitro* using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) test and Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Higher extraction yields were obtained for red maple buds regardless of the solvent used. Hot water extraction yields were higher than ethanol extraction counterparts, for both maple buds studied. The spectrophotometric assays revealed that extracts from red maple buds contain higher concentration of total phenolics, flavonoids and anthocyanins while the concentrations of hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins were higher in sugar maple bud extracts. Antioxidant capacity assays showed that, both sugar and red maple bud extracts presented real potential. Finally, strong relationships between the types and the amounts of phenolic compounds in maple buds and antioxidant capacity were determined. These results suggest that different valorisation fields for extracts from red and sugar maple buds could be anticipated.

keywords: *Acer rubrum*, *Acer saccharum*, buds, extracts, phenolic contents, antioxidant capacity, PCA

3.2 Introduction

Sugar maple (*Acer saccharum* M., SM) and red maple (*Acer rubrum* L., RM), two dominant species of Laurentian forest of Quebec, are responsible for most of the red and orange autumnal coloration of Northeastern American forests. They are also widely recognised for their sap, which is used for maple syrup production. The various phenolic constituents of maple syrup have drawn a huge research attention due to their potential positive effects on human health. Traditional and anecdotal medicinal claims for other parts of the plant in Amerindian medicine incited the interest to study different red maple tissues. Though up until now, leaves and bark of these trees have been extensively studied (L. Li et Seeram, 2011a, 2012; Nahar, Driscoll, Li, Slitt et Seeram, 2014; Zhang et al., 2014), only one study was published so far dealing with the involvement of phenolic compounds in the bud dormancy breaking (Thakur, 1977).

However, buds are the primary shoots-producers for dicotyledonous plants, and thus play a key role in the growth and plant architecture. They contain mass of meristems, that are undifferentiated embryonic tissues where regrowth of new tissues takes place after winter dormancy (Horvath, 2010). Bud extracts are also a category of plant products well known and widely used for gemmotherapy but also in homeopathy and in phytotherapy (Ieri et al., 2015). Tree buds are generally rich in plant growth hormones, microelements, vitamins, enzymes, free amino acids, polyphenols, nucleic acids and other bioactive compounds that are often found only in trace amounts in differentiated part of plants (Donno et al., 2015).

Among secondary plant metabolites, phenolic compounds represent potent antioxidants widely distributed in plant kingdom, particularly important in lignified tissues. They can be used as protective agents against oxidative damage of foods and biological systems (Royer et al., 2011). However, finding a novel and natural resource, and green and efficient extraction methods which lead to safe and economical bioactive natural products still remains a real challenge (David, Wolfender et Dias, 2015). The pruning of trees is a common practise performed in hardwood plantations, which would thus represent a potential source of branches containing buds, thus available for transformation and further use (N. Anderson et Mitchell, 2016). On the other hand, forest operations related to harvest also yield branches which are otherwise not forwarded to wood transformation industry. These branches contain buds which could be thus collected and forward into extraction plant (Dicko et al., 2016). In this context, the possibility of extraction of antioxidant phenolic compounds in significant amount with environmentally friendly solvents and methods from maple buds could lead to various valuable products.

To the best of our knowledge this is the first study of sugar and red maple bud extracts obtained with green solvents, water and aqueous ethanol. The extracts were analyzed by spectrophotometric assays to quantify total phenols along with specific classes of phenolic constituents, while DPPH• radical scavenging assay and ORAC test were used to assess the *in vitro* antioxidant capacity.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Plant materials

The dormant buds from sugar (*Acer saccharum*) and red maple (*Acer rubrum*) were harvested at the end of winter, from 10 to 24 March 2015. Voucher specimens (*Acer saccharum* Marsh, No. 176 and *Acer rubrum* L., No. 174) have been deposited at the herbarium of the Faculty of forestry, geomatics and geography (Faculté de foresterie géographie et géomatique) at Université Laval, Quebec City, Canada. The key morphological criteria described by Rouleau (1979) were used to confirm their identities. Eight randomly selected vigorous trees (per species) were collected, pooled and mixed well before freeze-drying. Dried bud samples were then carefully crushed in a mortar to avoid the overheating and the powders were kept at -20°C until extraction.

3.3.2 Extraction procedure

Maple buds (10 g) were extracted with 200 ml of solvent. The extraction with water was carried out using a water bath heated at 80 °C under reflux conditions for 1 hour. The extraction with ethanol (95%) was performed at room temperature by continuous shaking (230 rpm) for 24 h with an orbital shaker from Barnstead Lab-Line model 4633 (Melroso Park, IL, USA). For each extraction, the procedure was repeated twice at the same conditions to extract maximum of extractives.

The extracts were separated by filtration through Whatman No. 3 filter paper (Whatman International Ltd., UK) in a Buchner funnel. The recovered solvent (ethanol) was evaporated under vacuum at 50 °C using a rotary evaporator (Rotavapor® model R-215) until dryness, while aqueous extracts were firstly pre-concentrated under vacuum evaporator using same conditions and then freeze-dried. The yields of extraction were expressed as a percentage of the initial oven dry plant material (w/w).

3.3.3 Spectrophotometric determination of phenolic contents

3.3.3.1 Total phenol content

The total phenol content of each sample was assessed according to the Folin-Ciocalteu's method, as described by Scalbert, Monties, et Janin (1989). Gallic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as a standard for calibration curve. The total phenol content was expressed in gallic acid equivalents (mg. GAE / g dry extract).

3.3.3.2 Total flavonoid content

The total flavonoid content was determined according to the aluminum chloride method (AlCl₃) method developed by Brighente et al. (2007). Total flavonoid content was calculated as quercetin equivalents (mg. QE / g dry extract) using a calibration curve of quercetin hydrate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

3.3.3.3 Hydroxycinnamic acids content

Determination of hydroxycinnamic acid content in maple bud extracts was performed according to the method used by St-Pierre, Achim, et Stevanovic (2013). Chlorogenic acid (Sigma-chemical, St. Louis, MO, USA) as a calibration standard was used to express the hydroxycinnamic acid content (mg. CAE/g dry extract).

3.3.3.4 Determination of proanthocyanidins

Evaluation of proanthocyanidins was performed according to the procedure described by Wallace et Giusti (2010) with slight modifications. Twenty microliters of samples (1 mg / mL) were diluted with 2.380 ml of methanol then 100 μ L of 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) reagent (2% w/v in a methanolic sulfuric acid solution 6 N) was added. Protected from light, the mixture was incubated at room temperature for 30 min, and the absorbance of mixture was then recorded at 640 nm against a blank (methanol in place of DMACA reagent). The results of this assay were expressed in catechin equivalent (mg CE/g of dry extract).

3.3.3.5 Determination of total monomeric anthocyanin

Determination of anthocyanins in the bud extracts was conducted according to the pH differential method described by Lee, Durst, et Wrolstad (2005). Total monomeric anthocyanins were determined using cyanidin 3-O-glucoside (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) standard curve (mg C-3-gE/100g of dry extract).

3.3.4 *Antioxidant capacity evaluation*

3.3.4.1 DPPH• free Radical Scavenging Capacity test

The scavenging capacity of studied extracts for DPPH free-radical was assayed according to the protocol described by H. Li et al. (2009). The percentage of radical scavenging capacity (RSC) was expressed in terms of micromoles of Trolox equivalents per gram of dry extract (μ mol TEq./g) using a calibration curve obtained for this standard.

3.3.4.2 Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC assay)

The capacity of maple bud extracts to slow down oxidation of a probe molecule (fluorescein) in the presence of peroxy radical (AAPH) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was assessed by the ORAC assay using the method described by Kasangana, Haddad, et Stevanovic (2015). The ORAC_{FL} values of bud extracts were expressed in terms of micromoles of Trolox equivalent per gram of dry extract (μ mol T.Eq./g dry extract).

For all antioxidant capacity evaluations, the commercial standardized French maritime pine bark extract Oligopin[®] was used for comparison.

3.3.5 Statistical analysis

Polyphenol assessments and antioxidant capacity determinations were expressed as means of three independent determinations \pm standard deviation (SD). To assess the significance of the main effects of factors (nature of maple bud samples and type of extraction), the data sets were submitted to factorial analysis of variance (ANOVA), with the subsequent use of planned comparisons (contrast analysis), using the general linear model (*glm*) procedure of the SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.4 Results and discussion

3.4.1 Extraction yields of maple bud samples

Extracts of maple buds were obtained with hot water and 95% aqueous ethanol. Both of these solvents are considered eco-friendly and non-toxic, and convenient to food and pharmaceutical processing (Palma et al., 2013). The yields of extraction for all of these maple samples were presented in **Fig. 3.4**.

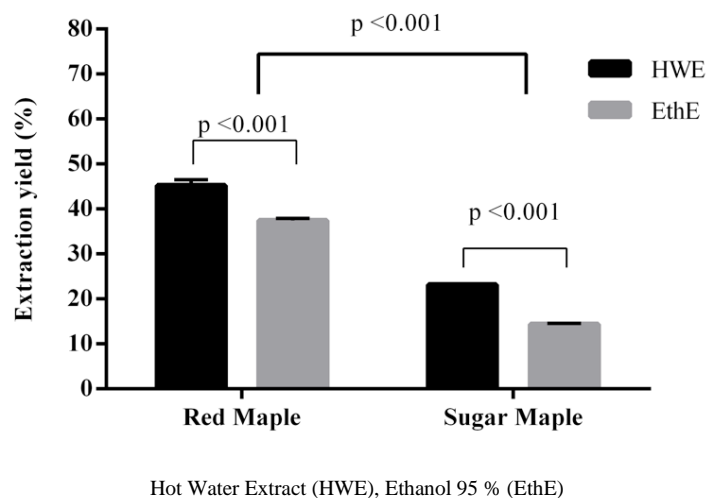


Figure 3.4: Extraction yields of maple bud samples.

Hot water extraction yields were consistently determined to be higher for all maple samples tested (45.3 ± 1.2 and 23.2 ± 0.2 for red maple and sugar maple buds, respectively) than those determined for ethanol extracts (37.5 ± 0.5 and 14.4 ± 0.2 for red maple and sugar maple buds, respectively). These findings are in agreement with those described in the literature (Royer et al., 2011) in which higher yields were obtained with hot water extraction. The higher polarity of the solvent (water versus ethanol) associated with a more elevated extraction temperature involved, could explain the increase in mass transfer rate resulting in higher extraction yields (Palma et al., 2013).

The planned contrast analysis indicated that, regardless of the solvent, extraction yields obtained from red maple buds were higher than those from sugar maple buds. These observations suggest potentially crucial differences in the chemical composition of red and sugar maple bud extracts.

Consequently, according to the breadth of these variations, different applications could be considered for the buds of these two maple species.

It is noteworthy that very few buds of North American hardwoods have been chemically studied. Poplar buds (Pichette et al., 2010), beech (Codignola, Maffei et Fieschi, 1988) and birch buds (Laitinen, Julkunen-Tiitto et Rousi, 2002) have already been investigated, but data on their extraction yields have not been provided. Also, some studies have focused on other sugar maple and red maple tissues (wood, leaves, bark). For instance, Royer et al. reported the hot water extraction yields from red maple whole branches, wood of branches, bark of branches, stem bark and whole stems ranging from 7 to 24% and from 4 to 12.5% for extraction yields with ethanol. In general, the values of extraction yields reported in the literature for various maple tree tissues were lower than those obtained for buds in this research. This could suggest that bud extracts will potentially provide high amount of bioactive compounds.

3.4.2 Quantification of phenolic compounds in maple bud's extracts

Among the renowned natural antioxidants occurring in plants (ascorbic acid, tocopherols, carotenoids etc.), phenolic compounds represent ubiquitous components of vascular plants. Phenolic acid derivatives, flavonoids, proanthocyanidins, anthocyanins, stilbenes etc. are some of main subgroups of phenolic compounds (Gülçin, 2012). The interest for plant polyphenols is growing due to multiple potential applications associated with the bioactivity of these molecules. In this research, the contents of following classes of polyphenols in maple bud extracts, namely flavonoids, hydroxycinnamic acids, proanthocyanidins, and anthocyanins, along with total phenol content, were determined and the obtained results are summarized in **table 3.3**.

Table 3.3: Evaluation of total phenolic content and others phenolic sub-classes

Experiments	Factors		Variables				
	Solvents	Samples	TPC	TFC	THA	PAs	TMA
1	HW	RM	458.4 ± 9.9	10.1 ± 0.4	31.5 ± 1.6	33.1 ± 2.0	103.3 ± 9.8
2		SM	280.4 ± 8.8	5.2 ± 0.5	230.8 ± 14.2	125.1 ± 5.1	26.2 ± 3.6
3	EtOH 95	RM	378.6 ± 1.1	6.5 ± 0.3	49.9 ± 3.3	42.1 ± 1.2	75.3 ± 9.3
4		SM	211.7 ± 9.6	6.1 ± 0.3	226.2 ± 17.2	121.8 ± 7.9	nd

Values are means ± standard deviation (n=3). Factorial analysis of the variance (ANOVA) was followed by planned orthogonal contrasts (statistical results shown in complementary data). The determinations were performed on Hot Water (HW) and ethanol 95% (EtOH 95) bud extracts of red maple (RM), sugar maple natural (SM). Total Phenols Contents (TPC) was expressed mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of dry extracts; Total Flavonoids Contents (TFC) in term of mg of quercetin equivalents (QE) per g of dry extracts, Total Hydroxycinnamic Acids (THA) in mg of chlorogenic acid equivalents (CAE) per g of dry extracts, Proanthocyanidins (PAs) in mg of catechin equivalents (CE) per g of dry extracts and Total Monomeric Anthocyanins (TMA) expressed in mg of cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g of dry extracts. nd (not determined)

By comparing bud origins (red vs. sugar maple) and solvents used for extraction (hot water vs. ethanol), statistical analysis provides data on the influences of these extraction parameters on each class of phenolic compounds determined.

The results of the statistical analysis (in complementary data), indicate that hot water is a more efficient solvent for flavonoids than aqueous ethanol for red maple buds (10.1 ± 0.4 mg QE./g compared to 6.5 ± 0.3 mg

QE./g) while somewhat higher flavonoid content was found in ethanol than in the water extract of sugar maple buds.

The total phenol content was found to be significantly higher in the red maple bud extracts than in sugar maple bud extracts for both extraction solvents. The total phenol contents of 458.4 ± 9.9 and 378.6 ± 1.1 mg GAE/g were determined for the extracts from red maple buds with hot water and ethanol 95%, respectively. On the other hand, only 280.4 ± 8.8 and 211.7 ± 9.6 mg GAE/g of total phenol contents were obtained with hot water and ethanol 95% for sugar maple buds. Consequently, the use of hot water as a solvent gave better results in terms of both extraction yields and total content of phenols irrespective of the nature of maple buds used.

Whatever the solvent used, the quantities of hydroxycinnamic acids were determined to be consistently higher in sugar maple bud extracts than in the red maple counterpart. The nature of solvent showed very slight effect on the extraction of this group of polyphenols.

The occurrence of precipitate in the aqueous ethanol extracts during the assessment of total anthocyanin content did not allow their complete evaluation. However, as the color of the extracts already indicated, the highest amount of anthocyanins was determined in red maple bud extract with hot water.

It has been shown in previous study (Royer et al., 2011) that the stem bark extracts contained the highest amount of total phenols (494.3 ± 3.9 mg expressed in terms of tannic acid equivalent/g of dry extract) and the best proanthocyanidin content (30.1 ± 0.2 mg of cyanidin chloride equivalent/g of dry extract) was determined for bark ethanol extract. The same plant tissue extract was determined to have the highest total flavonoid content (14.1 ± 6.5 mg of quercetin equivalent/g of dry extract), which is somewhat higher than the contents determined for bud extracts studied in this research, while higher hydroxycinnamic acid content (53.9 ± 5.2 mg chlorogenic acid equivalent /g of dry extract) was determined in hot water than in ethanol extracts. In the present study, the most important finding in relation to hydroxycinnamic acid content is that it is consistently higher in sugar maple bud extracts, regardless of the solvent used for extraction. The use of different standards for the expression of some of the results, and considering that we favoured the spectrometric methods appropriate for the particularity of the plant material studied, make the comparisons with literature data difficult. The results obtained in this study remain, however, in the same order of magnitude as those reported previously for other maple tissue extracts.

Finally, although anthocyanins have already been highlighted in the leaves of maple species, this, to the best of our knowledge, is the first report on their quantification in maple buds. We have been using the AOAC Official pH differential Method (2005.02) for total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines. Anthocyanins represent an important group of water-soluble pigments in plants, responsible for the red, purple, and blue coloration, primarily of flowers, fruits and leaves of angiosperms (Mateus et Freitas, 2008). The concentrations of anthocyanins in many foods and beverages have been estimated, and high concentrations are found mainly in fresh berries like cranberry (140 ± 28.5 mg/100g of fresh weight), in vegetables such as red cabbage (322 ± 40.8) (X. Wu et al., 2006) and in red (wines $240 - 350$ mg / litre) (Clifford, 2000). The value of 100 mg/100 g of dry weight obtained for the red maple buds is

lower than those reported for fruits and vegetables. However, the red maple bud anthocyanins are expected to have specific structures, which will be the basis for extensive chemotaxonomic studies of anthocyanins in maples from *Aceraceae* family.

3.4.3 Antioxidant activity of maple bud extracts

The interest in natural antioxidant was stimulated mainly by epidemiological studies indicating a relationship between the intake of foods rich in antioxidant and the incidence of several chronic diseases such as cardiovascular, diabetes, and cancer (Royer et al., 2013). Thus, many *in vitro* assays have been developed to evaluate the antioxidant capacities of natural products. Two chemical reaction mechanisms are usually described to be involved in majority of these assays: Hydrogen atom transfer (HAT) and single electron transfer (SET) patterns. Thus, some authors recommend the use of at least two tests involving different mechanisms to investigate and understand the antioxidant potential of complex materials. We have therefore selected two tests, the first one based on a predominantly SET mechanism, which is a radical scavenging capacity assay implicating the reduction of a stable DPPH• radical and the measurement of the disappearance of its color in the presence of an antioxidant (phenolic constituents of the studied extracts). The second test, ORAC, measures the ability of an antioxidant to inhibit fluorescence decay of a probe, such as fluorescein from its reaction with the peroxy radical (AAPH) by hydrogen donation (Huang et al., 2005). The results of antioxidant activity tests are summarized in **table 3.4**.

Table 3.4: Antioxidant capacity of maple bud extracts through DPPH and ORAC assays.

<i>Experiments</i>	<i>Factors</i>		<i>Variables</i>	
	<i>Solvents</i>	<i>Samples</i>	ORAC	DPPH•
1	<i>HW</i>	<i>RM</i>	4 305 ± 55	3 762 ± 476
2		<i>SM</i>	5 941 ± 206	867 ± 52
3	<i>EtOH 95</i>	<i>RM</i>	3 740 ± 44	3 325 ± 129
4		<i>SM</i>	5 981 ± 107	968 ± 155
5	OLIGOPIN®		14 348 ± 92	1 930 ± 101

Values are means ± standard deviation (n=3). Factorial analysis of the variance (ANOVA) was followed by planned orthogonal contrasts (statistical results shown in complementary data). The determinations were performed on Hot Water (HW) and ethanol 95% (EtOH 95) bud extracts of red maple (RM), sugar maple natural (SM).

Once again, the effects of extraction parameters on antioxidant capacity were revealed. The DPPH• radical scavenging capacity displayed no significant difference between hot water and ethanol bud extracts regardless of the maple species. Nevertheless, red maple bud extracts were determined to have more than 3 times higher DPPH antioxidant activities (3762 ± 476 and 3325 ± 129 $\mu\text{moles of TE/g}$, for hot water and ethanol red maple bud extracts, respectively) than the sugar maple bud extracts.

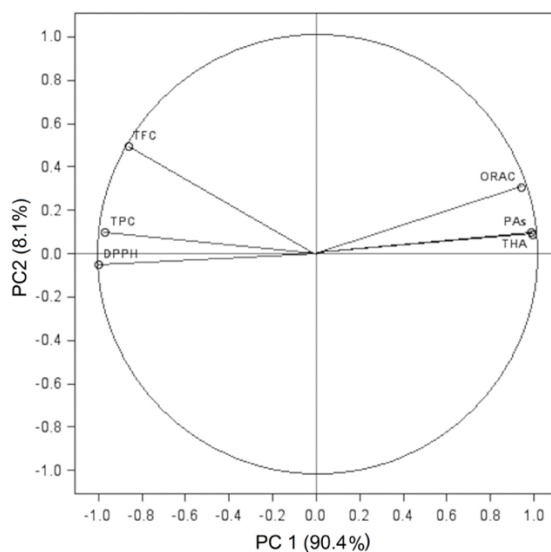
Interestingly, in contrast to DPPH assay, the antioxidant activity tested by ORAC assay was determined to be significantly higher for sugar maple than for red maple bud extracts. However, the differences found for these samples were not as important as it was with the case for DPPH test. Statistical analysis (in complementary

data) demonstrated that the ORAC values determined for hot water extracts of red maple were slightly higher than those determined for their ethanolic counterparts (4305 ± 55 vs. 3740 ± 44 $\mu\text{moles of TE/g}$), while no significant effect of solvent was noted for sugar maple bud extracts.

The DPPH• radical scavenging and ORAC assay were also performed on Oligopin®, a standardized hot water extract of maritime pine bark used as positive reference. The following values were determined for Oligopin®: $1\,930 \pm 101$ $\mu\text{moles of TE/g}$ for DPPH• radical and $14\,348 \pm 92$ $\mu\text{moles of TE/g}$ for ORAC. Comparing these results to those obtained for red maple bud extracts it can be noted that red maple bud extracts have radical scavenging capacity superior to Oligopin® when tested by DPPH•, but show inferior potential when evaluated by ORAC assay. Reported to be a polyphenol-rich extract, Oligopin® demonstrated higher amounts of all studied classes of polyphenols especially so for total phenolic content (572.9 ± 12.1 GAE. mg/g), total hydroxycinnamic acids (335.5 ± 3.7 CAE. mg/g) and proanthocyanidins (104.9 ± 9.6 CE. mg/g) than any of the maple bud extracts studied here (Royer et al., 2011).

3.4.4 Relationship between phenolic contents and antioxidant test.

The determinations of phenolic contents, and the antioxidant capacity assessments were used as active variables in the derivation of principal component analysis (PCA).



TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, PAS: Proanthocyanins, THA: Total Hydroxycinnamic

Figure 3.5: The correlation circle of phenolic compound classes and the antioxidant capacity assays.

The objective of this analysis was to specify the relationship between the variables of the phenolic contents and the antioxidant capacity determinations (Fig. 3.5). The Pearson correlations shown in table 3.5 were furthermore established between these variables in order to better define significance of these relationships.

Table 3.5: Pearson correlation coefficients between variables (quantities of each class of phenolic compounds and the antioxidant tests)

Variables	Pearson Correlation Coefficients			
	TPC	TFC	THA	PAs
ORAC	- 0.8737 (p = 0.0229) *	- 0.67539 (p = 0.1410)	0.96737 (p = 0.0016) **	0.9584 (p = 0.0026) **
DPPH	0.9570 (p = 0.0027) **	0.83867 (p = 0.0369) *	- 0.9991 (p < 0.0001) **	- 0.9946 (p < 0.0001) **

TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, PAs: Proanthocyanins, THA: Total Hydroxycinnamic Acid * Indicates statistically significant test at $P < 0.05$, ** Indicates statistically highly significant test at $P < 0.01$.

The results obtained from these analyses demonstrate that DPPH radical scavenging activity presented significant positive correlation with total phenolic content and total flavonoids contents, but significant negative correlation with proanthocyanidins and total hydroxycinnamic acids. On the other hand, ORAC activity results showed a significant positive correlation with hydroxycinnamic acids and a negative correlation with total phenolic content. These findings seem to corroborate with those described previously which also demonstrated that the effectiveness of *in vitro* antioxidant test was related to the nature of phenolic compounds. It has been demonstrated (Quideau et al., 2011) that the important physicochemical parameters such as the bond dissociation energy (BDE) of the phenolic O-H and the ionization potential (IP) of the compound might favour electron or hydrogen transfer mechanisms in the phenolic compounds. For this reason, phenolic acids (Van Hoyweghen, De Beer, Deforce et Heyerick, 2012) and proanthocyanidins (Robbins, Gong, Wells, Greenspan et Pegg, 2015) were often suggested to be strongly correlated to the ORAC assay which is based on hydrogen atom transfer. Thus, this would explain the high ORAC values obtained for the sugar maple bud extracts in the present study (having high total hydroxycinnamic acid contents), whereas red maple bud extracts rather exhibited strong DPPH• radical scavenging capacity.

3.5. Conclusion

We present for the first time, the results of phenolic composition and antioxidant capacity study of sugar and red maple bud extracts obtained with hot water and aqueous ethanol.

Higher yields of extraction were determined for red maple buds regardless of the solvent. The spectrophotometric determination of the phenolic contents revealed the highest contents of total phenols, flavonoids and anthocyanins in red maple extracts, while sugar maple bud extracts were determined to have higher concentrations of hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins. The nature of the solvent used for extraction seems to be of importance for better targeting phenolic compounds of interest from maple buds, as higher yields and contents were determined for water extracts. The antioxidant capacity assays showed that, both sugar and red maple buds extracted by hot water present really good antioxidant potential.

These major findings bring important elements of decision in terms of choice of maple buds according to species and of green solvent to be used for extraction of targeted phenolic compound class. The *in vitro* validation of biological properties and the identification of bioactive phenolic constituents of the studied extracts make part of our ongoing research. The results, once obtained, will confirm the applicability of maple bud extracts and/or their active ingredients for the design of new innovative non-wood forest products (NWFP).

3.6 Conflict of interest and Acknowledgments

The authors declare no conflicts of interest.

The authors are grateful for the financial support from the Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) and the Décacer and Levaco Inc. The authors are grateful to Mr. Clermont Levasseur from Decacer Inc. for his personal involvement during sampling of maple buds. We would like to thank Mr. Yves Bédard, Sara Hattab and Alex Simard for technical assistance, and Mme Helène Crépeau for statistical model validation.

Complementary data (Statistical analysis results)

A- Factorial analysis of the variance (ANOVA) for spectrophotometric evaluation of phenolic content.

Variables	Source of variation	p value
TPC	Maple buds	< 0.001 **
	Solvents	0.002 **
	Maple buds * Solvents	0.433 ns
TFC	Maple buds	< 0.001**
	Solvents	0.001**
	Maple buds * Solvents	< 0.001 **
THA	Maple buds	<0.001 **
	Solvents	0.189 ns
	Maple buds * Solvents	0.280 ns
PAs	Maple buds	<0.001 **
	Solvents	0.033 *
	Maple buds * Solvents	0.063 ns

B- Factorial analysis of the variance (ANOVA) for antioxidant capacity assays.

Variables	Source of variation	p value
ORAC	Sample	<0.001**
	Solvent	0.010**
	Sample * Solvents	0.002 **
DPPH	Sample	< 0.001 **
	Solvent	0.193 ns
	Sample * Solvents	0.0560 ns

4. Résultats complémentaires

Hormis les composés phénoliques, d'autres familles de composés naturels potentiellement intéressants ont été mis en évidence dans les extraits de bourgeons d'érable. Il s'agit notamment des dérivés d'acides aminés et de glycosides qui pourraient ouvrir le champ à d'autres domaines de valorisation. Leurs teneurs dans ces extraits ont donc également fait l'objet de nos travaux.

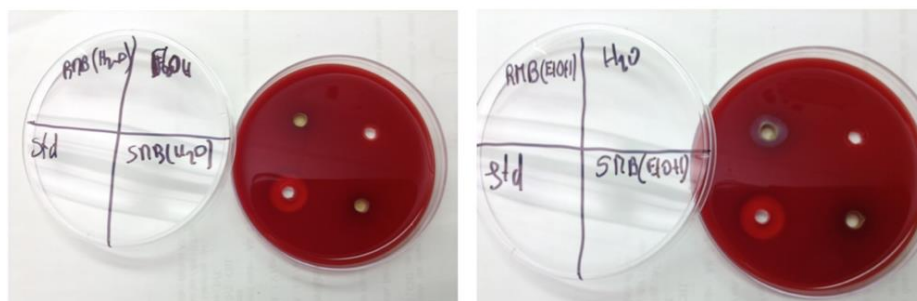
4.1 Essais de confirmation de la présence de saponosides

Comme indiqué précédemment, les saponosides figurent parmi les familles de composés naturels d'intérêt majeur pour une valorisation éventuelle d'extraits issus de bourgeons d'érable. La suspicion de leur présence dans nos extraits découle non seulement des études de chimiotaxonomie dans le genre *Acer*, mais également de la persistance de la mousse obtenue après l'agitation vigoureuse de l'extrait (**Figure 3.6**).



Figure 3.6 : Persistance de la mousse après agitation de l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable à sucre.

La persistance de la mousse nous a donc conduit à confirmer la présence de saponosides dans nos extraits par les tests d'hémolyse dont les résultats sont présentés dans la **figure 3.7**. Ainsi, quel que soit l'essence (érable à sucre ou érable rouge) et la nature du solvant utilisée pour l'extraction, aucune hémolyse n'a été observée sur les géloses de sang comparativement au standard (std).



Standard positif (Std), bourgeons d'érable rouge (RMB), bourgeons d'érable à sucre (SMB), extrait à l'eau chaude (H_2O) extrait éthanolique (EtOH), contrôle négatif (H_2O et EtOH)

Figure 3.7 : Activité hémolytique des extraits de bourgeons d'érable

Des tests réalisés sur des fractions enrichies (résultats non présentés) qui devraient contenir des saponosides se sont également avérés négatifs au test d'hémolyse. En somme, ces résultats indiquent que même si ces extraits de bourgeons d'érable contenaient des saponosides, leurs teneurs ne mériteraient pas d'envisager une valorisation des extraits sur leur simple présence. Il est cependant important de souligner que lorsque des saponosides avaient été identifiés dans des espèces d'érable (Glen'sk et al., 2009; Kupchan et Takasugi, 1970), seulement une (1) voir deux (2) structures avaient été identifiées. Des résultats similaires pourraient donc être attendus avec les espèces de notre étude. Des travaux complémentaires pourraient également être envisagés dans un but d'approfondir les connaissances de chimiotaxonomie sur les saponosides du genre *Acer*.

4.2 Estimation des dérivés d'acides aminés et de dérivés glucidiques

Les dérivés d'acide aminés et glucidiques ont ensuite fait l'objet de nos évaluations quantitatives. Les résultats de leurs teneurs dans les extraits aqueux et éthanoliques de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge sont présentés dans le **tableau 3.6**.

Les protéines totales ont été évaluées par la mesure de l'azote total dans les échantillons après combustion. Plusieurs méthodes de détermination de l'azote total sont décrites dans la littérature : méthode de Kjeldahl (digestion par l'acide sulfurique en présence de CuSO₄/TiO₂ puis dosage de l'ammoniac libéré), la méthode de Dumas (basé sur le principe de la combustion). La méthode que nous avons choisie est la plus simple, la plus rapide et la plus efficace pour l'estimation de l'azote total (Rhee, 2001). Utilisant l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA) comme standard de calibration, l'analyseur d'azote comprend un système de chromatographie en phase gazeuse, réputé pour sa sensibilité (estimée d'après le fabricant à 0,1 µg pour une gamme de 0,001 – 6,0 mg d'azote avec l'appareil utilisé). Là également, les dosages ont été réalisés dans la gamme de sensibilité maximale.

Tableau 3.6 : Exploration quantitative des principales familles de composés mis en évidence dans les bourgeons d'érables.

Echantillons	Solvants	Protéines (mg/g extrait)	Sucres (mg GFGE/g extrait)
RMB	HWE	45,5 ± 1,8 ^b	647,4 ± 42,4 ^c
	EthE	23,4 ± 1,5 ^c	726,6 ± 42,3 ^b
SMB	HWE	90,6 ± 0,2 ^a	863,9 ± 47,7 ^a
	EthE	47,7 ± 1,2 ^b	773,7 ± 17,7 ^b

Les teneurs en protéines et sucres totaux des extraits à l'eau chaude (HWE) et à l'éthanol 95 % (EthE) de bourgeons d'érable à sucre (SMB) et d'érable rouge (RMB) sont exprimés en moyennes ± écarts types de 3 mesures. Les sucres totaux ont été exprimés en mg de Galactose Rhamnose Arabinose Fructose Equivalent par gramme d'extrait sec (mg GRAFE/g extrait). Les tests statistiques ont été réalisés par une analyse factorielle de la variance et des contrastes planifiés à priori ont permis de comparer les moyennes des traitements pour une variable donnée.

Le criblage chimique réalisé sur les échantillons de bourgeon a indiqué que les protéines, positif à la ninhydrine pouvaient être la seule importante source en azote (tests aux alcaloïdes négatifs). Dans ce cas, la détermination de l'azote total pourrait bien refléter la teneur en protéines dans les bourgeons. Les résultats

montrent que les extraits de bourgeons d'érable peuvent contenir jusqu'à près de 10 % de dérivés d'acides aminés (surtout dans le cas des extraits aqueux de SMB). Il apparaît aussi que les extraits de SMB en contiennent environ deux fois plus que ceux de RMB et que l'eau chaude permet également d'en récupérer deux fois plus que l'éthanol 95.

En rappel, des acides aminés atypiques potentiellement toxiques sont rencontrés dans le genre *Acer*. Des acides aminés de types cyclopropyle ont déjà été identifiés dans les érables (Fowden et Pratt, 1973). L'hypoglycine A d'érable aurait été incriminée dans des myopathies de chevaux au Pays –Bas (Westermann, van Leeuwen, van Raamsdonk et Mol, 2016). Ainsi, des études complémentaires sur leur nature chimique et leur teneur dans les extraits d'érable s'avèrent indispensables pour envisager une sécurité d'emploi ou un potentiel de valorisation notamment dans le domaine de la microbiologie (prolifération d'agents pathogènes).

Les sucres totaux contenus dans les extraits de bourgeons d'érable ont été quantifiés par la méthode de Phénol – Acide sulfurique. Cette méthode évalue toutes les classes de sucres incluant les monosaccharides, les disaccharides, les oligosaccharides, les polysaccharides, mais également les hétérosides (glycoprotéines, glycolipides ...). En rappel, le milieu fortement acide (acide sulfurique concentré) entraîne une rupture des liaisons osidiques conduisant à la production de monosaccharides dont la déshydratation produit des dérivés de furfural, qui réagissent avec le phénol pour donner des composés chromophore jaune doré (Cui, 2005).

Les résultats rapportés dans le tableau ci-dessus indiquent une influence majeure du solvant sur les teneurs en sucre totaux dans les échantillons SMB et RMB. En effet lorsque l'éthanol était utilisé pour l'extraction de ces bourgeons, aucune différence significative n'a été observée dans leur teneur en sucres. Par contre, l'utilisation de l'eau chaude entraîne une augmentation significative des teneurs dans les extraits d'érable à sucre et une diminution significative dans ceux d'érable rouge. Ces résultats suggèrent potentiellement des différences majeures dans les structures de glycosides qui composent les extraits à l'eau chaude de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge.

La caractérisation structurale des glycosides qui représentent une portion majeure des extraits à l'eau chaude d'érable (SMB et RMB) paraît incontournable aussi bien à des fins de valorisation que de preuves d'innocuité pour une éventuelle valorisation de ces extraits d'érable.

4.3 Profils chimiques des composés phénoliques des extraits aqueux de RMB et SMB.

Le profil chromatographique en composés phénoliques des extraits aqueux de bourgeons d'érable à sucre (SMB) et d'érable rouge (RMB) a été analysé à 280nm, 350nm et 520 nm afin d'observer respectivement les acides phénols, les flavonoïdes et les anthocyanes. Les profils obtenus à 280 nm ont été présentés dans la **figure 3.8** ci-dessous.

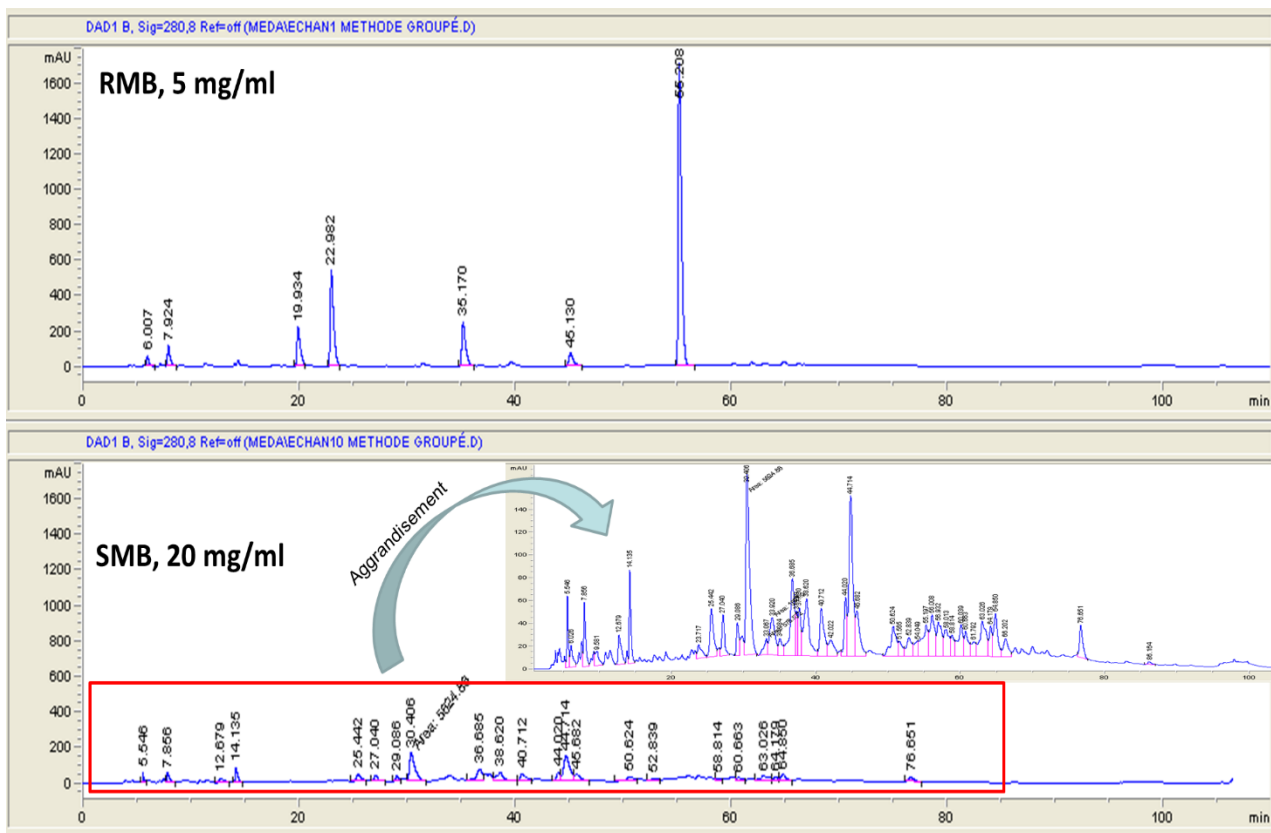


Figure 3.8 : Profils chromatographiques à 280 nm des extraits aqueux de bourgeons d'érable rouge (RMB) et d'érable à sucre.

Les profils chimiques indiquent clairement que l'extrait aqueux de bourgeon d'érable rouge (RMB) présente des quantités importantes en composés phénolique alors que celui d'érable à sucre (SMB) montrent une diversité chimique majeure.

5. Contributions majeures à l'amélioration des connaissances

1- Les bourgeons d'érable rouge (RMB) fournissent quel que soit le solvant utilisé pour les extractions, bien plus d'extractibles que les bourgeons d'érable à sucre (SMB).

2- Les extraits aqueux de RMB offraient un meilleur potentiel de piégeage des radicaux libres (test au DPPH) alors que ceux de SMB présentaient plus de potentiel dans la protection de cibles éventuelles de l'oxydation (test ORAC).

3- La teneur en anthocyanes a été évaluée pour la première fois pour des extraits provenant de l'érable rouge.

4- La nature du solvant d'extraction a montré une influence sur la teneur en sucres totaux, surtout dans le cas d'extraits de bourgeons d'érable à sucre où ces dérivés glucidiques représentent une part importante des phyto-constituants.

5-En ce qui concerne le profil chimique des composés phénoliques de ces extraits aqueux, celui de RMB présente des quantités importantes alors que celui de SMB montre une diversité chimique majeure

RÉSULTATS 4 : DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET UNE CAPACITÉ À MODULER LA VIABILITÉ DES NEUTROPHILES HUMAINS DÉCRITS POUR LA PREMIÈRE FOIS POUR DES EXTRAITS D'ÉRABLE ROUGE

1. Contexte / Transition

Les précédents résultats ont suggéré que les composés phénoliques, surtout ceux contenus dans l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge (*Voir article 2*), pouvaient présenter un certain potentiel dans la valorisation d'extractibles d'érable. Afin d'évaluer ce potentiel, il est essentiel:

- de connaître la valeur réelle de la capacité antioxydante de cet extrait par rapport à d'autres antioxydants connus sur le marché,
- de connaître la nature chimique et la teneur individuelle des composés phénoliques à l'origine de cette activité antioxydante,
- d'apporter des preuves d'absence de toxicité de cet extrait.

Les résultats des essais menés pour répondre à ces différentes exigences ont été rapportés dans l'article 3 publié dans *Chemistry and biodiversity*.

2. Résumé

Du fait de ses performances en contenu phénolique et capacité antioxydante, l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge (RMB) a été retenu pour des essais supplémentaires. Afin d'apprécier l'envergure de son potentiel de valorisation, la capacité antioxydante de cet extrait a d'abord été comparée à celle de références connues sur le marché. Nous avons ensuite procédé à une caractérisation et une quantification individuelle des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante de cet extrait. Enfin, une exploration de la toxicité de l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge a été menée à travers l'étude de son effet sur la viabilité de neutrophiles humains.

Les résultats indiquent qu'en fonction des tests utilisés, l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge a présenté une capacité antioxydante égale ou supérieure à celle des antioxydants de références utilisés. Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de déterminer pour la première fois dans des extraits d'érables rouge, le cyanidine-3-O-glucoside, la quercétine-3-O-galactoside, la quercétine-3-O-arabinoside et la quercétine. De plus, la quantification individuelle des composés phénoliques par la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance a révélé que la ginnaline A à 117,0 mg / g est le composé principal de l'extrait d'eau chaude de RMB. Enfin, l'extrait de RMB n'a provoqué aucune toxicité ni modification significative du processus d'apoptose des neutrophiles humains jusqu'à 100 µg/mL. Ces résultats permettent d'anticiper de nombreux champs d'application de l'extrait aqueux de RMB.

3. Article 3

Antioxidant capacity, phenolic constituents and toxicity of hot water extract from red maple buds

Published in Chemistry and biodiversity 2017 Jun;14(6). doi:10.1002/cbdv.201700028

by:

Naamwin R. Meda,^{a,b,c,d} Patrice E. Poubelle,^d and Tatjana Stevanovic^{*a,b,c}

Affiliation :

^a Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR), Département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval, Québec, Canada.

^b Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec City, Canada.

^c Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Université Laval, Québec, Canada

^d Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du CHU de Québec, Département de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

*Corresponding author at: Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR), Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, 2425 rue de la Terrasse, Pavillon G-H Kruger, Québec, QC, G1V 0A6 Canada. Tel.: +1 418 6562131x7337; Télécopieur: (418) 656-5262. E-mail address: Tatjana.Stevanovic@sbf.ulaval.ca

3.1 Abstract

The present study reports, for the first time, the results of the antioxidant capacity and the phenolic composition of a hot water extract from red maple buds (RMB), as well as its safety. In this regard and comparatively to antioxidant standards, this extract exhibits a significant antiradical capacity when tested by *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH•) and anion superoxide trapping assays. High-resolution mass spectrometric (HRMS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses permitted to determine for the first time, in red maple species, *cyanidin-3-O-glucoside*, *quercetin-3-O-galactoside*, *quercetin-3-O-arabinoside* and *quercetin*. Also, the quantification of individual phenolics by high-performance liquid chromatography (HPLC) method revealed that ginnalin A at 117.0 mg/g is the major compound of RMB hot water extract. Finally, using flow cytometry evaluation, the extract of RMB was determined to have no toxicity neither to cause significant modification of apoptosis process, up to concentration of 100 µg / mL, on human peripheral blood neutrophils. These results allow anticipating various fields of application of RMB water extract.

Keywords: Red maple buds, Antiradical capacity, Phenolic compounds, Neutrophil viability.

3.2 Introduction

One of the major characteristics of aerobic metabolism is the production of highly unstable oxidant reactive species including those of oxygen (ROS), nitrogen (RNS), sulfur (RSS) and the free radicals originating from single electron transfer (Carocho et Ferreira, 2013). The increase of the amount of these free radicals would foster the occurrence of disease conditions such as inflammation, cardiovascular and neurodegenerative diseases, ageing and cancer (Mahfoudhi et al., 2016). Epidemiological, clinical and nutritional studies brought evidence that the input of exogenous antioxidants in human diet might have positive impacts on health by preventing the development of age-related disease, particularly associated with oxidative stress (Moo-Huchin et al., 2015). Oxidation process is also one of the major reasons for the deterioration of food, cosmetics and pharmaceutical products during processing and storage (Miguel, 2010). The incorporation of antioxidants helps increase the shelf life of these products. The strict control of synthetic antioxidant uses and the increased public interest for natural products have compelled scientists and manufacturers to spend much time and money prospecting for natural and safe sources of antioxidants (Gülçin, 2012). Regarding their diversity of phytochemicals, antioxidants from plants represent a useful alternative for product preservation and human health. Phenolic compounds are one of the most important and studied groups of natural antioxidants (Maqsood, Benjakul, Abushelaibi et Alam, 2014).

Red maple (*Acer rubrum* L.) is a native maple species of Northeastern American forests. Its sap is used for syrup production (González-Sarrías, Yuan, et al., 2012). Ethnopharmacological reports reveal that Native Americans used this plant for treating sores, back or limb pains, sore eyes, hemorrhoids and cough (Bi, Gao, et al., 2016). So far, available phytochemical analyses of red maple have been obtained from its twigs (Wan et Zhou, 2013), stems (Wan, Yuan, Li, et al., 2012), leaves and bark (González-Sarrías, Li, et al., 2012; Zhang, Ma, Yuan et Seeram, 2015). There is just one study of the chemistry of buds from sugar maple reported in the literature. It has revealed the presence of phenolic compounds involved in breaking the bud dormancy (Thakur, 1977). Being undifferentiated embryonic tissues and contributing to the implementation of new tissues after winter dormancy, buds might contain phenolic compounds different from those described in other plant parts (Horvath, 2010).

In this regard, the aim of our study was to investigate the possibility of obtaining natural and safe antioxidants from hot water extract of red maple buds (RMB). The antioxidant capacity of this extract was assessed in comparison with standard antioxidants, through DPPH• and anion superoxide radical scavenging tests. Phenolic constituents were then isolated from hot water extract of RMB, characterized and quantified. Finally, normal human blood neutrophils were incubated in the presence of this extract to evaluate its effect on cell viability, as determined by flow cytometry.

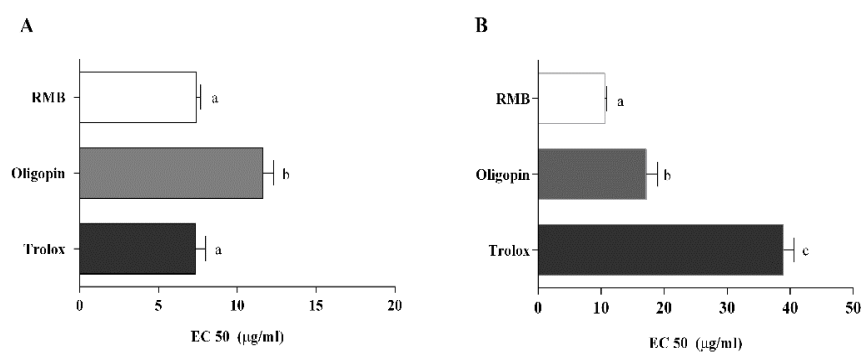
3.3 Results and Discussion

3.3.1 Antioxidant capacity of the RMB hot water extract

Radical scavenging capacity or antiradical capacity that reflects the ability of a system to scavenge free radicals is one of the several methods used to evaluate the antioxidant capacity of complex mixtures extracted from

plants and foods (Apak et al., 2013). DPPH• is a stable free radical commonly used to evaluate the antioxidant potential of natural compounds (X. M. Ma, Liu et Shi, 2007). Superoxide anion (O₂•⁻), a reduced form of molecular oxygen, is one of the most important and biologically relevant reactive oxygen species in living organisms. It plays an important role in the production of other highly reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical or singlet oxygen. These ROS can cause serious damages to cells and are implicated in various diseases (Görlach et al., 2015). The results of the DPPH• and O₂•⁻ radical scavenging assays are resented in **Fig. 3.9**.

Regardless of the test used, RMB hot water extract displayed good radical scavenging potential compared to the standards used in this study. Indeed, no significant difference was found for extract antioxidant capacity (EC₅₀ = 7.40 ± 0.56 µg / mL) compared to *Trolox* (EC₅₀ = 7.35 ± 1.30 µg / mL) when DPPH• test was used as free radical (*Fig. 1-A*). It exhibited the best antioxidant capacity (EC₅₀ = 10.60 ± 0.50 µg / mL compared to 38.94 ± 1.67 µg / mL for *Trolox* and 17.16 ± 1.83 µg / mL for *Oligopin*) when tested for its capacity of superoxide anion scavenging (*Fig. 1-B*). These results suggest that RMB hot water extract could have a real potential in antioxidant field valorization. However, since DPPH• and O₂•⁻ tests are chemical evaluations only, further studies involving radicals in biological systems (*in vitro* or *in vivo* assays) will be required to better decipher the real value of RMB as an antioxidant for humans.



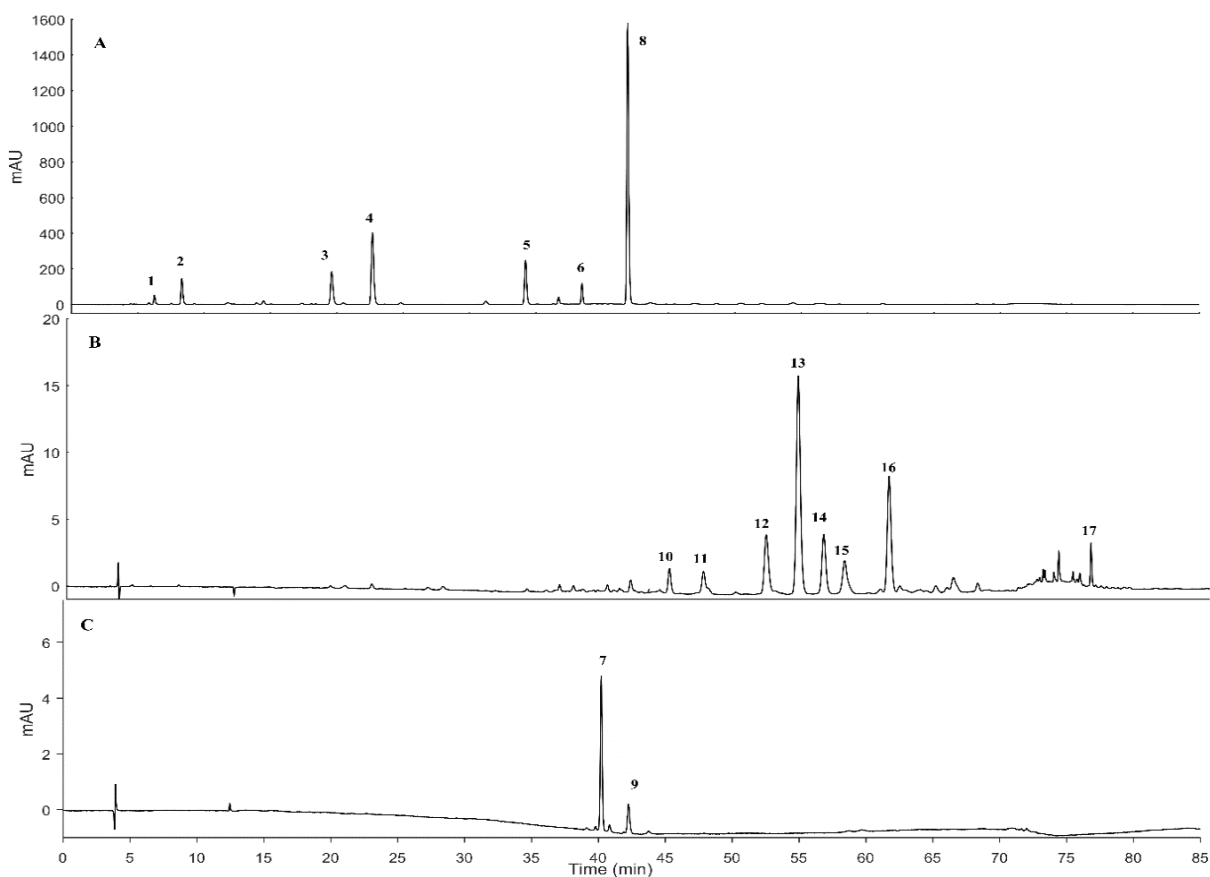
A-DPPH scavenging test, B- Superoxide anion radical scavenging test. Each sample was measured in triplicate. Statistical differences were examined by a one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test. For each determination, histograms with the same right case letters are not significantly different at $p < 0.05$.

Figure 3.9: Evaluation of antioxidant capacity of RMB hot water extract.

3.3.2 Characterization of phenolic constituents of RMB hot water extract

Phenolic compounds are among the most important natural antioxidants. In plant materials, they show a positive correlation with antioxidant activities (Foti, 2007). In order to determine the major phenolic constituents of RMB hot water extract, these were separated by HPLC according to their retention times and detection at 280 nm for benzoic acid derivatives, at 350 nm for flavonoids and at 520 nm for anthocyanins (**Fig. 3.10**). Based on their spectroscopic data (UV-vis, HRMS, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy results) and by comparison with literature data, a tentative structural assignments of these compounds are summarized in **Table 3.8** and **Fig. 3.11**. Thus, cyanidin-3-O-glucoside (**7**), quercetin-3-O-β-D-galactoside (**13**), (Coqueiro et al., 2013) quercetin-3-O-β-D-arabinoside (**16**) (Schieber, Hilt, Conrad, Beifuss et Carle, 2002) and quercetin (**17**) were detected for

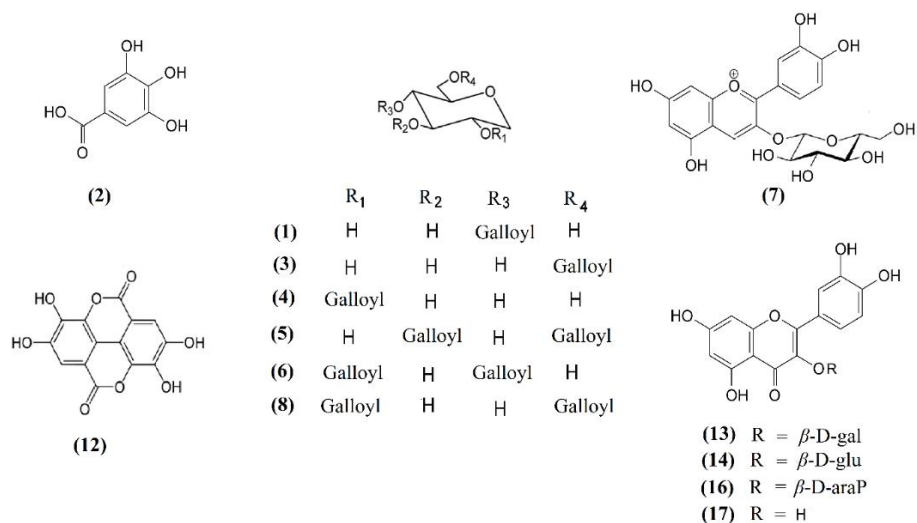
the first time in red maple species. In contrast, maplexin A (**1**), (Wan, Yuan, Li, et al., 2012) gallic acid (**2**), (Nguyen et al., 2013) ginnalin B (**3**) and ginnalin C (**4**), (Wan et Zhou, 2013) maplexin D (**6**) (Wan, Yuan, Li, et al., 2012) and ginnalin A (**8**) (Wan et Zhou, 2013), ellagic acid (**12**) and quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**) (Tai et al., 2012) were previously described in red maple bark, twigs and leaves. The use of ^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC analysis allowed for the compound **5** to be identified as 3, 6-*O*-digalloyl-1,5-anhydro-D-glucitol. Not strictly identified because of their low quantities for NMR analysis, the ESI-HRMS data of compounds **9**, **11** and **15** suggest structures already characterized in other maple species. These might be cyanidin 3-*O*-[2''-*O*-(galloyl)- β -D-glucoside] (S. B. Ji et al., 1992b), quercetin 3-*O*-[β -D-xylosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside] (Tung, Ding, Kim, Bae et Kim, 2008) and quercetin-3-*O*-(2''-galloyl)- β -D-galactopyranoside, respectively (Kim, Woo, Shin et Park, 1998).



Phenolic acids (A), Flavonoids (B) and Anthocyanins (C)

Figure 3.10: Separation of the phenolic compounds detected by HPLC in the RMB hot water extract.

Compared to other parts of red maple, the hot water extract of buds seems to contain, in addition, various flavonoids and anthocyanins along with the hydrolysable tannins, derivatives of gallic acids discussed previously. Anthocyanins (red to purple pigments) and flavonols (colourless to yellow pigments) are well known natural antioxidants and pigments (Petrucci et al., 2013) and finding these compounds in RMB extract could provide many fields of application for extract from RMB.



Maplexin A (1), Gallic acid (2), Ginnalin B (3), Ginnalin C (4), 3,6-di- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol (5), maplexin D (6), Chrysanthemins (7), ginnalin A (8), Ellagic acid (12), Quercetin-3-O-galactoside (Hyperoside, 13), Quercetin-3-O-glucoside (Isoquercetin, 14), Quercetin-3-arabinoside (Guaijaverin, 16), Quercetin (17)

Figure 3.11: Identification of phenolic compounds in the RMB hot water extract.

3.3.3 Quantitative analysis of phenolic constituents

The concentration of identified phenolic constituents of RMB extract are presented in **Table 3.9**. The calibration curves were traced for each compound and experimentation was carried out at the maximum absorption wavelength. Five concentrations were used in the linear range indicated and each calibration point was replicated for three times. Good linearity between peak areas and compound concentrations was observed for all standards, referring to the regression coefficient (R^2). The sensitivity of the method was checked through the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Thus, the quantification method used to estimate the amounts of individual phenolic in RMB hot water extract were considered adequate for its linearity and sensitivity.

Thus, based on the results of quantification, gallotanins are obviously the major phenolic compounds of RMB hot water extract. Indeed, this class of compounds represents nearly 94.5 % of the total phenolic content determined by addition of the individual amounts of the major compounds. In particular, ginnalin A (8), B (3) and C (4) represent over 75 % of the total phenolic content with 41.4%, 11.0 % and 24.4%, respectively. These compounds have already been reported to be the major phenolic compounds identified in red maple leaves, but their concentrations were not reported (Apostolidis et al., 2012; González-Sarrías, Li, et al., 2012).

Moreover, the antioxidant capacity of these compounds against DPPH• free radical has been evaluated previously (Wan, Yuan, Li, et al., 2012). Interestingly, ginnalin A ($EC_{50} = 17.74 \mu M$), ginnalin B ($EC_{50} = 32.70 \mu M$) and ginnalin C ($EC_{50} = 30.49 \mu M$) have all shown a better antioxidant activity than ascorbic acid ($EC_{50} = 71.02 \pm 1.61 \mu M$), a well-known antioxidant standard (Bendich, Machlin, Scandurra, Burton et Wayne, 1986). Considering the concentrations of these compounds in RMB hot water extract (Table 2), it is therefore not surprising that this extract has shown a good antioxidant capacity. On the other hand, cyanidin-3-O-glucoside (7) (0.4 mg / g) and quercetin-3-O-β-D-galactoside (13) (6.6 mg / g) were determined to be

respectively major anthocyanin and flavonoid of RMB hot water extract. These compounds have already been reported for their good capacity of free radical scavenging (Brito, Areche, Sepúlveda, Kennelly et Simirgiotis, 2014; Zhao, Dou, Wu et Aisa, 2013).

3.3.4 Effects of RMB hot water extract on viability of human blood neutrophils

Ginnalins (González-Sarrías, Li, et al., 2012; González-Sarrías et al., 2013) have been found to exhibit anti-proliferative effects without inducing apoptosis against some human cancer cells. However, in these two reports ginnalin effects on apoptosis were tested through morphological changes of chromatin distribution only. Interestingly, maplexins (González-Sarrías, Yuan, et al., 2012) besides their anti-proliferative effects on cancer cells were shown to have pro-apoptotic effects the intensity of which depending on cancer cell lines. However, the maplexin effects on apoptosis of cancer cells were found only by studying their labelling with annexin V / PI, tracers of apoptosis more sensitive than morphological changes of chromatin distribution. It remains possible that ginnalins could induce pro-apoptotic effects when studied with annexin V / PI tracers. Since ginnalins and maplexins were present in RMB hot water extract, we decided to choose a non-proliferative cell type, but very sensitive to apoptosis. So, we next investigated the effects of RMB hot water extract on neutrophil survival. Neutrophils, the most abundant white blood cells in the circulation (50 -70% of the circulating leukocytes), are short-lived cells which express multiple mediators implicated in host defense as well as in numerous pathologies from infections, inflammation, cancers to auto-immune diseases (Mantovani et al., 2011). Considering their capacity to produce pro-inflammatory mediators, these non-dividing mature cells spontaneously undergo apoptosis (constitutive programmed cell death) to maintain immune homeostasis (Kobayashi et al., 2005). So, despite the lack of information about pharmacokinetics of ginnalins and maplexins, and considering their polarity that could suggest less digestive absorption, it was useful to ensure the safety of these compounds against a cell type such as neutrophil.

Flow cytometry of cells double labelled by FITC- Annexin-V / PI clearly distinguishes “programmed” cell death (apoptosis) from “accidental” cell death (necrosis). Indeed, early apoptosis, mainly characterized by the exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the cytoplasmic membrane, is associated to preferential binding of annexin V. When the cell membrane integrity is lost, which is the case of necrotic cells, they stain for PI, an intercalating agent that binds to fragmented DNA (Riccardi et Nicoletti, 2006). Viable cells with intact plasma membrane excluding PI and without any exposure of phosphatidylserine appear therefore An V (-) and PI (-). Both An V (+) and PI (+) staining were termed late apoptotic cells (Wlodkowic, Skommer et Darzynkiewicz, 2009). By using this method, neutrophil viability was studied by incubating cells for 24 h in the presence of different concentrations of RMB hot water extract and the results are presented in **Fig. 3.12**. **Fig. 3.12-A** illustrates neutrophil apoptosis as detected by flow cytometry. For each concentration, viable neutrophils are in the lower left quadrant (Q3) with An V (-) and PI (-). The right lower quadrant (Q4) corresponds to early apoptotic neutrophils stained by An V (+) only, whereas the upper right quadrant (Q2) represents late apoptotic neutrophils (An V [+], PI [+]). Necrotic neutrophils are shown in the upper left

quadrant (Q1) and are characterized by their An V (-) and PI (+) labelling. Numbers of neutrophils for each condition were expressed as percentages of the total cell counts (10 000) and are presented in **Fig. 3.12-B**.

Comparatively to controls treated with the solvent/vehicle used to dissolve RMB hot water extract, no significant differences of neutrophil viability were found, as analyzed by annexin V and PI staining up to 10 µg / mL of RMB hot water extract.

At 100 µg / mL, RMB extract significantly increased the percentage of viable neutrophils from 18.3% ± 0.7 to 27.0% ± 2.2 (**Fig.4-B1**) which was associated with a clear-cut decrease (but not significant) of early apoptotic neutrophils from 45.8% ± 2.8 to 40.1% ± 3.9 without any modifications of the two other conditions. Circulating neutrophils without any activation have a short lifespan and undergo spontaneous/constitutive apoptosis, a condition which is greatly enhanced by their isolation from peripheral blood for *in vitro* incubations (Franz, Muñoz, Heyder, Herrmann et Schiller, 2015). Savoie et al., (2000) reported that, depending on the donor, 30 to 60% human blood neutrophils freshly isolated and incubated for 24 h (37°C, 5% CO₂) in RPMI-1640 supplemented with fetal calf serum (ranging from 5–10%) were apoptotic cells. Similarly, neutrophils incubated in our experimental control conditions (1% FBS only) showed 71.9% of apoptotic cells (early + late apoptosis), with 18.3% of viable cells and 8.1% of necrotic cells. Moreover, the significant increase of viable neutrophils under 100 µg / mL of RMB extract is suggestive of a stimulation/activation of neutrophils, as described by McCracken et Allen, (2014).

Lastly, substantial modifications reflected by a significant decrease of early apoptotic cells associated with a significant increase of late apoptotic and necrotic neutrophils were recorded at 500 µg / mL of RMB extract (**Fig 4-B2, B3, B4**). It is important to note that viable cells incubated under this concentration of RMB extract remained similar to the percentage of viable cells under control conditions (22.3% ± 0.9 and 18.3% ± 0.7, respectively). The decrease of early apoptotic cells (from 45.8% ± 2.8 to 27.0% ± 5.2) associated with an increase of late apoptotic neutrophils (from 26.1% ± 2.7 to 45.8% ± 1.3) was more obvious than the increase of necrotic cells (from 8.1% ± 1.2 to 12.4% ± 0.9). However, these results suggest a potential cytotoxicity effect of the RMB extract at this concentration.

The inappropriate release of granule contents of neutrophils is harmful and toxic and it contributes to chronic inflammation (Görlach et al., 2015). That is why constitutive apoptosis of neutrophils remains essential for homeostasis and function of the immune system. Therefore, this experimentation suggests the potential use of RMB hot water extract at concentration up to 100 µg / mL without modification of neutrophil apoptosis pattern. Moreover, the slight stimulation of neutrophils observed at this concentration that increases their viability could be useful for increasing natural defenses. Nevertheless, more investigations are required regarding neutrophil functions under the RMB extract, especially about their capacity to destroy pathogens.

Table 3.7: Tentative structural assignment of major compounds present in hot water extract from red maple buds

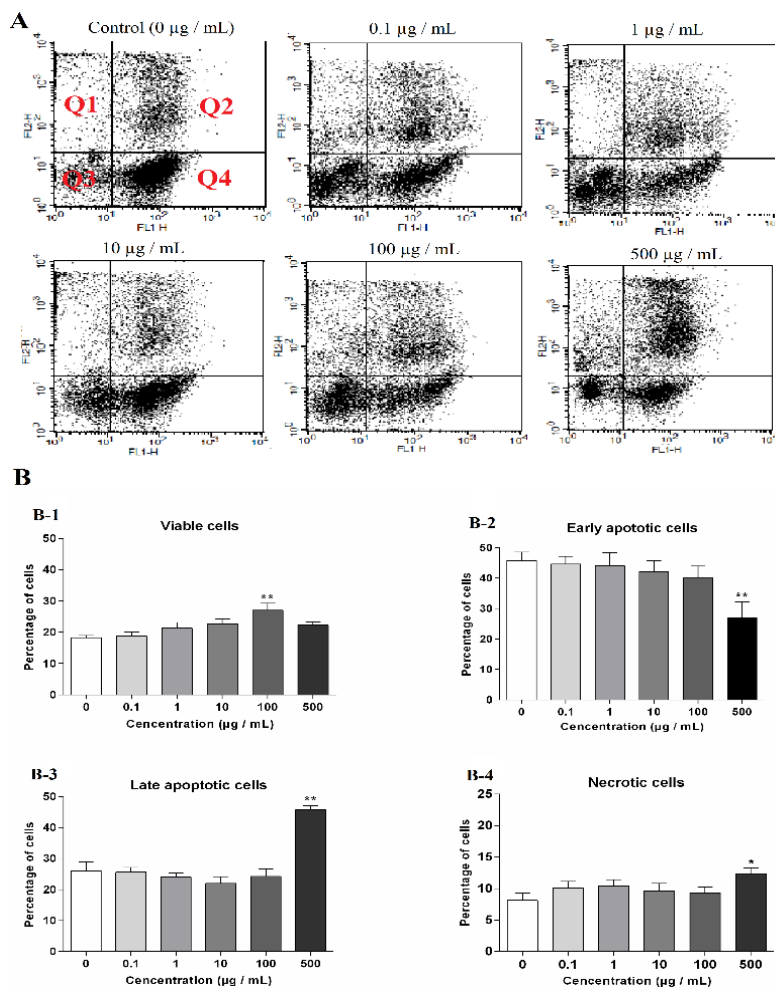
Peak N°	RT (min)	UV DAD (λ max)	HRMS (+)	Mass	Formula	Calculated Mass	Error (ppm)	Identification
1	6.3	273	317.0863	316.0791	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.0794	1.16	Maplexin A (3- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol)
2	8.4	271	171.0287	170.0214	C ₇ H ₆ O ₅	170.0215	0.73	Gallic acid
3	19.7	273	317.0886	316.0813	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.0794	-5.95	Ginnalin B (6- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol)
4	22.8	275	317.0894	316.0821	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.0794	-8.1	Ginnalin C (2- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol)
5	34.4	275	469.0988	468.0914	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃	468.0904	-2.21	3,6-di- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol
6	38.5	276	469.0970	468.0897	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃	468.0904	1.44	maplexin D(2,4-di-O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol)
7	40.7	276, 516	449.1073	449.1078	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1084	1.34	Chrysanthemine (Cyanidin 3-O glucoside) ^(a)
8	41,8	275	469.0981	468.0908	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃	468.0904	-0.79	ginnalin A (2,6-di- O-galloyl-1 ,5-anhydro-D-glucitol)
9	42.3	277, 520	601.1142	601.1148	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	601.1193	7.48	Galloylcyanidin hexoside derivat
10	44.6	262, 356	627.1556	626.1482	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	0.17	Quercetin O-dihexoside
11	47.1	255, 354	597.1448	596.1397	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₆	596.1319	0.48	Quercetin 3-O-pentosylhexoside
12	51.7	254, 368	303.0126	302.0053	C ₁₄ H ₆ O ₈	302.0055	3.29	Ellagic acid ^(a)
13	54.0	256, 354	465.1008	464.0935	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955	2.7	Hyperoside (Quercetin 3-O- β -D-galactopyranoside)
14	55.9	256, 352	465.1023	464.0950	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955	1.08	Isoquercetin (Quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside)
15	57.4	267, 358	617.1136	616.1038	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	616.1006	4.22	Quercetin O-galloyl-hexoside
16	60.7	256, 354	435.0915	434.0849	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434.0849	0.92	Guajaverin (Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside)
17	73.7	256, 370	303.0494	302.0427	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.0427	1.90	Quercetin ^(a)

^a Identification by comparison of UV, MS data and co-chromatographed with an authentic standard

Table 3.9: Quantitative analysis of major compounds present in hot water extract from red maple buds

Peak N ^o	Standard used	λ (nm)	Linear range ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Regression equation AUC = a [C] + b ^(a)	LOD ^(b) mg/L	LOQ ^(c) mg/L	R ² ^(d)	Content (mg /g of extract)	
1	Ginnalin C	280	25 – 3000	AUC = 29.1 [C] + 89.0	0,09	0,27	0.990	4.9 ± 0.2	
2	Gallic Acid	280	20 – 100	AUC = 36.8 [C] + 402	1,6	4,9	0.9980	10.9 ± 0.5	
3	Ginnalin C	280	25 – 3000	AUC = 29.1 [C] + 89.0	0,09	0,27	0.990	31.1 ± 1.1	
4								68.8 ± 2.4	
5								22.6 ± 0.6	
6								10.6 ± 0.3	
7	Cyanidin-3-O-glucose	520	2 – 0.1	AUC = 51.3 [C] - 5.1	0.065	0.19	0.999	0.4 ± 0.0	
8	Ginnalin A	280	1000 – 5000	AUC = 43.1 [C] + 2227	10,7	32,5	0.9990	117.0 ± 10.5	
9	Cyanidin-3-O-glucose	520	2 – 0.1	AUC = 51.3 [C] - 5.1	0.065	0.19	0.999	0.1 ± 0.0	
10	Quercetin-3-O- β -galactoside	350	5 – 30	AUC = 20.6 [C] - 3.5	0,82	2,50	0.997	0.6 ± 0.0	
11								0.6 ± 0.0	
12	Ellagic acid	254	2 – 10	AUC = 21.5 [C] - 7.3	0,14	0,43	0.988	1.8 ± 0.1	
13	Quercetin-3-O- β -galactoside	350	5 – 30	AUC = 20.6 [C] - 3.5	0,82	2,50	0.997	6.6 ± 0.2	
14								1.8 ± 0.0	
15								1 ± 0.1	
16	Quercetin -3-O-arabinoside	350	2 – 10	AUC = 21.7 [C] + 0.2	0,05	0,14		3.1 ± 0.1	
17	Quercetin	350	2 – 10	AUC = 44.5 [C] - 7.2	0,07	0,21	0.992	0.2 ± 0.0	
								Total phenol acids	268.0
								Total flavonoids	13.9
								Total anthocyanins	0.5
								Total phenolic compounds	282.4

^(a) AUC (peak area), *a* the intercept and *b* the slope, [C] concentration in $\mu\text{g} / \text{mL}$, ^(b) LOD for limit of detection and ^(c) LOQ limit of quantification, ^(d) R² for regression coefficient



(A) Representation of flow cytometry analysis of neutrophils incubated with graded concentrations of RMB hot water extract and labelled with annexin V and PI. (B) Incubated neutrophils were individualized into viable cells (An^{V(-)} / PI⁽⁻⁾; B-1), early apoptotic cells (An^{V(+)} / PI⁽⁻⁾; B-2), late apoptotic cells (An^{V(+)} / PI⁽⁺⁾; B-3) and necrotic cells (An^{V(-)} / PI⁽⁺⁾; B-4). Results are expressed as means \pm sem for n=5 independent experiments. Statistical differences between treated cells and control cells (treated with vehicle) were obtained by a one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (Ctr vs Treated) and significance was set at $p < 0.05$ (* significant, ** highly significant).

Figure 3.12: Effects of RMB hot water extract on neutrophil viability after a 24 h incubation.

3.4 Conclusions

The present study permitted to evaluate the antiradical/antioxidant capacity of RMB hot water extract in comparison to common antioxidants products such as *Trolox* or *Oligopin*. Indeed, both radical scavenging tests applied, with DPPH or superoxide anion, have confirmed important capacity of the RMB extract. The characterization of extract's phenolic profile revealed the presence of several gallotannins, along with the quercetin glycosides and cyanidin derivative that could be responsible for the antiradical activity of the extract. Furthermore, the flavonoid and anthocyanidin derivatives are for the first time reported for red maple species. Also, the quantification of individual phenolic compounds is the first report on red maple buds, and it revealed large amounts of maplexins and ginnalins, among which the major constituent of RMB extract, ginnalin C represents more than 10 % of the extract.

Finally, RMB hot water extract showed a slight stimulatory effect on neutrophils at 100 µg / mL with a significant alteration of neutrophil viability at 500 µg / mL. Elucidation of compounds that could spearhead these toxic effects and their molecular mechanism of action is part of our ongoing research.

3.5 Experimental Section

3.5.1 General experimental procedures

Spectrophotometric assays were performed using a *Varian Cary® 50* UV-Vis Spectrophotometer. HPLC analyses were carried out with an *Agilent 1100 series* HPLC value system equipped with a quaternary pump, a diode-array detector (DAD), an autosampler, and a column compartment. Analytical separations were carried out on a *Zorbax® SB-C18* column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). High-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis was obtained on a Time-of-Flight (TOF) 6210 series connected to the HPLC instrument. Offline processing with MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis was used to calculate molar formula. 1260 Infinity semi-preparative HPLC was used for compound purification using *Zorbax® SB-C18* prepHT columns (250 mm x 21.2 mm, 7 µm) at a flow rate of 10 mL / min. All 1D nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) and 2D NMR [¹H-¹H correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear single-quantum coherence (HSQC), heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC)] experiments were acquired on a DD2 spectrometer. All of the above materials were from *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA). NMR offline data processing was carried out using the Mnova software package (*Mestrelab* Research, Santiago de Compostela – Spain.). Column chromatography (CC) separations were performed on a glass column (65 × 4.3 cm; H × i.d.) loading with silica gel (200 - 300 mesh, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), *Ambertlite XAD 7-HP* resin CC (20-60 mesh) or *Sephadex LH-20* (25-100 µm) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Viability assays were carried out by flow cytometry, using *FACS Calibur* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and the *CellQuest* software. Excitation was set at 488 nm, and the emission filters were set at 525 nm and 585 nm, respectively.

3.5.2 Chemicals and reagents

Quercetin, ellagic acid, cyanidin-3-glucoside, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (*DPPH*), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (*Trolox*), nitroblue tetrazolium (NTB), β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), phenazine methosulphate (PMS), propidium iodide (PI) staining and Dextran T-500 were supplied by *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA). The 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (*HEPES*), Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (*RPMI 1640*), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and Lymphocyte Separation Medium (LSM) were obtained from Wisent Inc. (Québec, Canada). *Oligopin®* was offered by Yannick Piriou of *DRT Nutraceutics*, (Vielle-St-Girons, France). *Annexin V-FITC* (AnV) was obtained from *BD Biosciences Pharmingen* (Mississauga, ON). Ultra-pure water from *Milli-Q* (18.2 MΩ cm, MILLIPORE, Billerica, MA USA) was used for HPLC analysis. Methanol (MeOH),

acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), butanol (n-BuOH), formic acid (FA) used were ACS grade, purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

3.5.3 Plant materials

The dormant RMB were harvested at the end of winter from 10 to 24 March 2015. Voucher specimens (*Acer rubrum* L., No. 174) have been deposited at the herbarium of the Faculty of forestry, geomatics and geography (Faculté de foresterie géographie et géomatique) at Université Laval, Québec, QC, Canada. The key morphological criteria described by *Rouleau* (Rouleau, 1979) were used to confirm its identity. Collected buds were freeze-drying, carefully crushed in a mortar and the powder were kept at -20°C until extraction.

Extraction and isolation of phenolic compounds

RMB (150 g) were extracted with hot water (3 L) at 80°C under reflux conditions during 1 hour, for three times. The combined extracts obtained by filtration through *Whatman* No. 3 filter paper (*Whatman International Ltd.*, Maidstone UK) in a *Buchner* funnel were pre-concentrated under vacuum at 50°C using a rotary evaporator (*Rotavapor*[®] model R-215) and then freeze-dried. Freeze-dried extract of RMB (50 g) was suspended in water and then successively partitioned with DCM (3 x 1L), EtOAc (5 X 1L), and n-BuOH (5 X 1L). DCM fraction (0.2 g), EtOAc fraction (16.8 g), n-BuOH fraction (12 g) and remaining water fraction (17.9 g) were obtained. A part of EtOAc fraction (4 g) was adsorbed on silica gel CC packed in DCM. The column was first eluted with DCM, then with a mixture of DCM and MeOH (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, and 2:8) and finally with MeOH. Twelve fractions were obtained. Fractions 5, 6 and 7 were mixed (1.2 g) and applied to *Sephadex LH 20* gel column eluted with H₂O-MeOH (9:1 to 0:1) to yield five major sub-fractions (A–E). The sub-fraction B (202 mg) was purified by semi-preparative HPLC using 1% FA in water (A) and methanol (B), 0 - 25 min (5 - 20% B) to yield compound **2** (12 mg, Rt = 8.4 min), compound **5** (25 mg, Rt=34.4 min) and compound **6** (5 mg, Rt=38.5 min). The fractions C (53 mg) and D (76 mg) were subjected to semi-preparative HPLC using water (A) and MeOH: ACN (3.1) (B), in gradient program elution (0 - 5 min, 40 % de B then 5 - 15 min, 40 - 60% B), to afford compound **13** (18 mg, Rt=54.0 min), compound **14** (7 mg, Rt=55.9 min), compound **16** (10 mg, Rt=60.7 min) and compound **17** (3 mg, Rt=73.7 min).

The n-BuOH fraction was dissolved in water and loaded onto an *Ambertlite XAD 7-HP* resin CC. The column was rinsed with distilled H₂O (Fr BX-1) and then eluted with increasing proportion of MeOH, 25% (Fr BX-2A), 50% (Fr BX-2B), and 100% (Fr BX-2C). These 3 sub-fraction of BX-2 were consecutively applied on *Sephadex LH-20* CC (eluted with H₂O: MeOH from 1:0 to 0:1). Some fractions were chromatographed on semi-preparative HPLC using 1 % FA in water (A) and methanol (B), 0 - 25 min (5 - 20% B) and 0 - 20 min (20 - 40% B), to give compound **3** (14 mg, Rt =19.7 min), compound **4** (30 mg, Rt =22.8 min), compound **7** (4 mg, Rt =40.7 min) and compound **8** (125 mg, Rt =41.8 min).

Apart from the remaining water-soluble portion (5 g) was subjected to *Ambertlite XAD 7HP* resin CC washed with H₂O (AX-1) and phenolics were desorbed with MeOH MeOH (AX-2). This sub-fraction, was applied to *Sephadex LH-20* CC (eluted with H₂O: MeOH from 1:0 to 0:1) to give four main other fractions. The first was

further sequentially purified by semi-preparative HPLC using 1 % FA in water (A) and methanol (B), 0 - 25 min (5 - 20% B), to afford compound **1** (6 mg, Rt =6.3 min) and compound **12** (3 mg, Rt =6.3 min).

3.5.4 *Measurements of antioxidant capacity*

Concentrations between 0.1 and 100 µg / mL of RMB extract were used to screen its capacity to trap radicals. Trolox (soluble analogue of vitamin E) and Oligopin® (commercial Standardized French maritime pine bark extract) were used as positive standards at the same range of concentrations for comparison. The free radicals DPPH• and superoxide anion (O₂^{•-}) were used and the percentages of radical scavenging capacity (RSC) were calculated using the equation: % RSC = [(A_{control} - (A_{Sample} - A_{Extract}) / A_{control}] x 100 in which A_{control} is the absorbance measured for the mixture without extract, A_{sample} is the absorbance of the mixture with the extract and A_{extract} is the absorbance of the extract. The log (concentration) - response curves were plotted, and the RSC (considered as antioxidant capacity) of samples was calculated by linear regression analysis and expressed as EC₅₀ concentration (µg/mL), the effective concentration needed to reduce the concentration of radicals by 50 %.

DPPH• test : The scavenging activity of the DPPH• free-radical was assayed according to the protocol described by L. Li et al., (2009) with minor modifications. Briefly, the assay was conducted in a 96-well microplate using 100 µL of sample test and 150 µL of DPPH solution (70 mg / L). The absorbance was recorded at 516 nm, after 30 min.

Superoxide anion test : The assay was performed following study of Royer, Diouf et Stevanovic, (2011) Briefly 1 mL of a solution of NTB (100 µM in phosphate buffer, pH 7.4) was mixed to 1 mL of NAD solution (468 µM in phosphate buffer, pH 7.4) and 1 mL of sample. Started by adding 100 µL of PMS solution (60 µM in phosphate buffer, pH 7.4), the reaction mixture was incubated at 30°C for 15 min and the absorbance was measured at 560 nm against blank (phosphate buffer solution).

3.5.5 *HPLC-MS Analysis*

Chromatography conditions: The mobile phase of separation was composed by solvent (A) 5 % FA in water and solvent (B) ACN: MeOH: water (90:5:5). The elution gradient was: 0 - 5 min (0% de B), 5 - 25 min (0 - 6% B), 25 - 30 min (5 - 8% B), 30 - 45 min (8 - 10 % B), 45 - 50 min (10 - 15% de B), 50 - 90 min (15 - 30% B), 90 -95 min ((30 - 50% B), 95 - 105 min (50% de B), 105 - 106 min (50-0% de B) et de 106 - 110 min (0% de B). RMB hot water extract was injected at 2.5 mg / mL (10 µL), the flow rate was 0.7 ml/min, and column temperature was set at 30°C. The DAD detector was used to monitor at 280, 350 and 520 nm, and UV spectra were recorded in the range from 200 to 600 nm for peak characterization.

Mass spectrometry analysis: HPLC analysis was coupled to the mass instruments for electrospray positive (ESI+) HRMS analysis. The ESI-TOF parameters were applied as following: gas temperature: 325°C, drying gas: 5 L/min, nebulizer pressure: 30 psig, capillary Voltage (+): 4000 V; cone voltage, 65 V, skimmer: 60 V and fragmentor: 70 V. The mass spectra were recorded in the range of m/z 100 - 1000.

3.5.6 HPLC quantification of the phenolic constituents

The phenolic compounds were quantified by external standard method. Calibration curves were obtained for each phenolic compound, using appropriate concentration range of purified compounds isolated from RMB hot water extract. For non-purified compounds, the concentrations were expressed as equivalents of the compound having the most similar structure. The extract was then injected in triplicate, and each compound concentration was expressed (in mg / g of RMB hot water extract) as the average value calculated in each case. Based on the standard deviation of the detector response (σ) and the slope (S), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined as follows: $LOD = 3.3\sigma/S$; $LOQ = 10\sigma/S$.

3.5.7 Determination of viability of neutrophils

The effects of RMB hot water extract on viability of normal human blood neutrophils were studied by flow cytometry using Annexin V-FITC/ propidium iodide (AnV / PI) as tracers. Neutrophils are the most numerous polymorphonuclear cells in blood. They were obtained from fresh citrate anticoagulated venous blood of five healthy volunteers. The procedures were performed under the guidelines of the research ethical committee of the “Centre hospitalier universitaire de Québec” and in compliance with the Helsinki's declaration.

Neutrophil preparation. Isolation of neutrophils was performed as described by Chakravarti et al. (2009) with slight modifications (Chakravarti et al., 2009). Briefly, platelets were first eliminated from whole blood by centrifugation and removal of the platelet rich plasma. Then, differential sedimentation using the standard method of dextran at 2% was used to eliminate erythrocytes. Granulocytes were separated from monocytes and lymphocytes by gradient centrifugation over a Ficoll-Paque cushion. Neutrophils were collected at the bottom and contaminating erythrocytes were then lysed in hypotonic solution. After washing, neutrophils were counted and resuspended at 10×10^6 /ml in RPMI 1640 medium supplemented with 1% of FBS, 10 mM HEPES and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin) for assays.

Measurement of viability by flow cytometry. A volume of the cell suspension neutrophils (100 μ L) were exposed to RMB hot water extract at final concentrations of 0.1, 1, 10, 100 and 500 μ g /mL and incubated for 24 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. At the end of treatment, the cells were collected and washed with phosphate buffer solution. Resuspended in 100 μ L of binding buffer, 2 μ L of AnV were added and the mixture was incubated for 15 min at room temperature in the darkness. After that time, 400 μ L of cold binding buffer was added and the cells were vortexed. Finally, 2.5 μ L of PI solutions (50 μ g/mL) were added and also left for 15 min in the dark. The stained cells were analyzed by flow cytometry and data from 10 000 events were recorded. Compensations were performed to set quadrants.

3.5.8 Statistical analysis

All experiments were conducted at least three times and results are expressed as means \pm SEM (Standard error of mean). Statistical tests were performed with SAS 9.4 software (SAS Institute, NC). Statistical differences between experimental groups were examined by a one-way ANOVA followed by a Tukey's or Dunnett's post hoc test and significance was set at $p < 0.05$.

3.7 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Décacer and Levaco Inc, No RDCPJ-452658-13. The authors are grateful to Mr. Clermont Levasseur from Decacer *Inc.* for his personal involvement during sampling of maple buds and to Yves Bédard and Pierre Audet for technical assistance, as well as to Dre Isabelle Allaeys and Jouda Gamara for the biological assays training.

3.8 Author Contribution Statement

Author Contribution Text. TS, PEP and NRM: designed the experiments.

NRM: performed experiments, interpreted results and wrote the initial draft.

TS, PEP: participated to analyse the data and revised the manuscript.

All authors approved the final version for publication

4. Contributions majeures à l'amélioration des connaissances

1- Nous avons démontré pour la première fois que l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge présente un potentiel antioxydant comparable à des antioxydants de référence commerciaux.

2- Nous avons identifié pour la première fois dans l'espèce des hétérosides de cyanidine et de quercétine, prouvant ainsi une différence de composition chimique entre les bourgeons (tissus embryonnaires) et les autres tissus.

3- Nous avons quantifié pour la première fois la ginnaline A, qui représente à elle seule plus de 10% de l'extrait aqueux de bourgeons.

4- Nous avons prouvé pour la première fois que l'extrait n'avait aucun effet délétère sur la viabilité des neutrophiles humains jusqu'à 100 μM

RÉSULTATS 5: LES GALLOTANINS DÉRIVÉS D'ANHYDROGLUCITOL ET SONT RESPONSABLES DE L'EFFET PRO-APOPTOTIQUE DE L'EXTRAIT D'ÉRABLE ROUGE SUR LES NEUTROPHILES

1. Contexte / Transition

Bien qu'aucune toxicité n'ait été observée sur les neutrophiles jusqu'à 100 μ M, l'extrait à l'eau chaude des bourgeons d'érable rouge a néanmoins montré sa capacité à moduler la viabilité de ces cellules majeures de l'immunité à plus forte concentration. Des investigations complémentaires ont été menées face à l'immense potentiel d'exploitation de telles propriétés, notamment dans la résolution du processus inflammatoire où la survie des neutrophiles est incontestablement liée au développement de nombreuses pathologies chroniques.

Les résultats de l'étude qui ont permis de mettre en évidence les composés responsables de cette activité biologique sont rapportés dans *l'article 4* en cours de rédaction.

2. Résumé

L'apoptose des neutrophiles est un point de contrôle essentiel pour la résolution de la réponse inflammatoire car elle contribue à arrêter les fonctions immunitaires de ces cellules primordiales. Cette étude a porté sur l'implication de gallotannins d'érable dans l'induction de l'apoptose décrite précédemment sur des neutrophiles humains traités par un extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge (RMB-hwe). En utilisant la cytométrie de flux, l'effet sur la viabilité des neutrophiles de fractions issues de la partition liquide / liquide de RMB-hwe a d'abord été évaluée. Les analyses chimiques réalisées sur ces fractions ont ensuite permis de connaître leurs compositions, afin d'évaluer la capacité de leurs principaux constituants à induire l'apoptose des neutrophiles.

Les résultats indiquent que les fractions acétate d'éthyle et butanol qui concentrent les principaux gallotannins d'érable ont démontré les meilleures activités pro-apoptotiques. La ginnalin A, la ginnalin 3,6 et la ginnalin C, qui sont les principaux composés phénoliques des fractions actives ont significativement augmenté le taux de neutrophiles en apoptose tardive à la concentration de 100 μ M. Enfin, des effets additifs et antagonistes dépendant des concentrations de ces molécules actives dans les mélanges, ont été rapportés pour la première fois pour ces gallotannins. En particulier, les effets concernant la ginnalin C ont permis d'expliquer les propriétés biologiques des fractions acétate d'éthyle et butanol. Les mécanismes d'action moléculaire de ces composés pourraient fournir des indications précieuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour faciliter la résolution des maladies inflammatoires où ces neutrophiles sont incriminés.

3. Article 4

Building paper for Food and Chemical Toxicology

Anhydroglucitol-core gallotannins from red maple buds induce apoptosis of human blood neutrophils

Naamwin R. Meda,^{a,b,c,d} Tatjana Stevanovic^{a,b,c} and Patrice E. Poubelle*^d

^a Département des Sciences du Bois et de la Forêt, Faculté de Foresterie et Géomatique, Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR), Université Laval, 2425 rue de la Terrasse, Pavillon G-H Kruger, Québec, QC, G1V 0A6, Canada.

^b Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, 2440 Hochelaga Blvd, Québec, QC, G1V 0A6, Canada.

^c Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés (CERMA), Université Laval, 1065 avenue de la médecine, Québec, QC, G1V 0A6, Canada.

^d Département de Médecine, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, 2705 Laurier Boulevard, Québec, QC, G1V 4G2, Canada.

*Corresponding author: Patrice E. Poubelle
Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) 2705, boulevard Laurier T-1-49
Québec (Québec) CANADA G1V 4G2
E-mail: patrice.poubelle@crchudequebec.ulaval.ca

3.1 Abstract

Apoptosis of neutrophils represents an essential checkpoint for the resolution of inflammatory response because it contributes to shut down the immune functions of these primordial cells. This study investigated the potential role of anhydroglucitol-core gallotannins (ACGs), in the increase of apoptosis previously described for human neutrophils treated by hot water extract from red maple buds (RMB-hwe). Fractions obtained from liquid / liquid extracts of RMB-hwe were firstly assessed for their effects on neutrophil viability using flow cytometry method. The phytochemical analysis of these fractions led to investigation of the ability of their major compounds to induce neutrophils apoptosis. Ethyl acetate and butanol fractions containing the major gallotannins exhibited better pro-apoptotic effect. Ginnalin A, Ginnalin 3,6 and Ginnalin C, which were the major ACGs of active fractions significantly increased the rate of late apoptotic cells at 100 μ M. Finally, additive and antagonist effects are reported here for the first time for these phenolic compounds. These effects are related to their concentrations in mixtures, especially for ginnalin C and provide explanation about the proprieties of the studied fractions. The molecular mechanism of action of these compounds could provide valuable insights for the development of novel therapeutic approaches to facilitate resolution of neutrophil-mediated inflammatory diseases.

3.2. Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are the most abundant leukocytes of human blood as they represent around 60–70% of the white blood cell pool. Generated in the bone marrow from myeloid stem cells, these cells are released into the blood where they spend a short life-span of 8–20 h to 1–4 days in tissues (Geering et Simon, 2011; Witko-Sarsat et al., 2000). This is because neutrophils extend their lifespan during their trans-endothelial migration to join the sites of infection for inflammatory response. Indeed, terminally differentiated cells of the immune system, these cells are critical components because they are the first line of defense against invading pathogens like bacteria and fungi. Neutrophils ensure their immune function by combining their ability to engulf microorganisms by phagocytosis, trigger the production of harmful Reactive Oxygen Species (ROS) and by releasing an array of toxic weapons including antimicrobial proteins (Amulic et al., 2012).

However, too much delayed death of neutrophils in tissues can cause unwanted and exaggerated inflammation. In fact, the severity and the outcome of many inflammatory diseases (pneumonia, sepsis, rheumatoid arthritis, ...) are associated and frequently correlated with the neutrophil life-span in blood, sputum, or synovial fluid of patients (El Kebir et Filep, 2013). So the proper removal of these cells is a crucial issue in the resolution of inflammation as this prevents release of toxic intracellular components that can damage healthy tissue into their surroundings. Thus, the death program in neutrophils needs to be well controlled to provide a nice balance between their immune functions and their safe clearance (Luo et Loison, 2008).

Neutrophils can die in several manners processes mainly including apoptosis (type 1 programmed cell death), autophagy (type 2 programmed cell death), necrosis (catastrophic form of death) and the newly recognized NETosis (Geering et Simon, 2011; Iba, Hashiguchi, Nagaoka, Tabe et Murai, 2013). Under healthy conditions and in order to maintain homeostatic cell numbers, aged neutrophils die spontaneous. The physiological form of neutrophils death is apoptosis (also called constitutive apoptosis). At inflamed sites, neutrophils are often killed through death receptor-induced apoptosis. This process is led by macrophages and involve death receptor ligands. Moreover, the phagocytosis process, the production of abundant amounts of ROS or release of granules speed up neutrophils apoptosis at sites of infection. Apoptotic neutrophils are then cleared by macrophages in the liver, spleen, and bone marrow (Akgul et Edwards, 2003; Geering et Simon, 2011).

Many similarities are found between neutrophils undergoing apoptosis and other cell types. A very complex network of signaling pathways tightly controls cell apoptosis. These networks lead to activation of caspases and transcription factors such as Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP Kinases) and Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B). They also modulate the expression as well as degradation of key pro- and anti-apoptotic proteins. Apoptosis pathways are usually summarized in two major, i.e. the extrinsic and intrinsic pathway (McCracken et Allen, 2014). The first one is death receptor pathway, mediated by the superfamily of Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR) that activate caspase cascade via the activation of caspase-8 as an initiator caspase. The second involves mitochondria and the Bcl-2 family members, resulting in activation of

caspase cascade via activation of caspase-9 as an initiator caspase. The effector caspase 3 is the last product of caspase cascade pathways. It is responsible for the cleavage of a number of death substrates that lead to the well-known characteristic hallmarks of an apoptotic cell. In short, these pathways are attractive targets to modulate life and death decisions in neutrophils (El Kebir et Filep, 2013).

Several medicines for the treatment of a wide spectrum of diseases are of natural origin or inspired by natural products. Indeed, throughout the ages, Nature and plants in particular, have been the source of various active molecules covering a range of therapeutic potential (Cragg et Newman, 2013; Harvey, 2008). Uncommon gallotannins only found in maple (*Acer*) species, anhydroglucitol-core gallotannins (ACGs) have been examined in a wide range of investigations for biological proprieties since these last years. Antioxidant activities, (Wan, Yuan, Li, et al., 2012) antiglycating potential, (H. Ma, Liu, et al., 2016) antiproliferative, (González-Sarrías, Li, et al., 2012; González-Sarrías et al., 2013; González-Sarrías, Yuan, et al., 2012) α -glucosidase inhibitory as well as antidiabetic effects (H. Ma et al., 2015; Seeram et al., 2012; Wan, Yuan, Li, et al., 2012) were described for the major phenolic compounds found in various parts of red maple (*Acer rubrum*). Previously, we reported that these galloyl derivatives (**Figure 3.13**) were determined as major constituent of hot water extract from red maple buds (RMB-hwe) and exhibited a pro-apoptotic effect on human neutrophils (Meda, Poubelle et Stevanovic, 2017).

To date, some ACGs were known to induce apoptosis of cancer cell lines. No effects on the viability of immune cells have been assigned to ACGs until now. In this study, we report for the first-time the evidences that major ACGs from RMB-hwe have ability to induce apoptosis of human neutrophils. Polyphenolic-enriched fractions from liquid–liquid partitioning of bud’s crude extract were first evaluated for their effect on neutrophil viability in bio-guided experiments. Then major compounds of these fractions were purified and checked for neutrophil apoptosis. Finally, mixtures of bioactive compounds were assayed to confirm the effects previously determined for RMB-hwe and its fractions. Considering the scope of the apoptosis of neutrophils on the resolution of inflammatory response, highlighting these kinds of effects of ACGs opens wide field of investigation, in particular in chronic inflammatory diseases in which immune cells are implicated.

3.3 Materail and methods

3.3.1. Preparation of polyphenolic-enriched fractions and pure compounds from RMB-hwe

Hot water extract of red maple buds (RMB-hwe), its polyphenolic-enriched fractions from liquid–liquid partitioning as well as pure compounds used for assays were obtained as previously described by Meda et al., (2017b). Briefly, RMB were extracted with hot water at 80 °C under reflux conditions during 1 h and pre-concentrated under vacuum before freeze-drying. A part of freeze-dried extract was re-suspended in deionised water and successively partitioned with dichloromethane, ethyl acetate and butanol. Ethyl acetate fraction (EAF), butanol fraction (BF) and remaining water fraction (RWF) were selected for further investigations. Major ACGs from RMB-hwe (**Figure 3.13**) were previously isolated in our laboratory by a series of chromatographic procedures and unequivocally characterized by ¹H-, ¹³C- and 2D- nuclear magnetic resonance,

and high resolution mass spectroscopic methods. The purity of compounds was also checked by HPLC peak area normalization and it was found to be superior to 98% for all studied polyphenolics. The fractions and molecules were stored at -20°C until their use.

3.3.2 *Phytochemical assessments*

3.3.2.1 Quantification of phenolic compounds

The major phenolic compounds of RMB-hwe fractions were assessed using the validated HPLC quantification methods described by Meda et al., (2017b). Samples were prepared in a 10% DMSO-water mixture and analysed in triplicate. The concentration of each major phenolic compound was expressed in mg / g of sample by using their calibration curves previously described.

3.3.2.2 Total sugar determination

The total carbohydrate content of RMB-hwe and fractions were evaluated by Phenol-sulfuric acid spectrophotometric method described by Albalasmeh et al., (2013) Albalasmeh, Berhe, et Ghezzehei (2013) with slight modification. Briefly, 4 mL aliquots of samples at 50 µg/mL were mixed to 1 mL of phenol reagent (aqueous solution at 5% w/w). After stirring, 5 mL of concentrated sulfuric acid was added to the mixture and the whole was incubated in dark for 10 minutes and then cooled in ice bath for 20 minutes. Finally, the absorbance of the mixture was measured at 490 nm versus water as the blank. The total sugar content was expressed in term of mg of galactose, rhamnose, arabinose and fructose equivalent / g of sample (mg GRAFE/g). These monosaccharides were chosen since the most frequently encountered products of acid hydrolysis of poly- and oligosaccharides from plant extracts (Chow et Landhäusser, 2004). For this, a solution consisting of the stoichiometric mixture (1: 1: 1: 1) of these 4 sugars was used as a standard, under the same conditions.

3.3.2.3 Total protein content estimation

The nitrogen content of RMB-hwe and its fractions were used to estimate their total proteins content as described by Rhee (2001). Ball-shaped capsules containing approximately 20 mg of sample were introduced into the analyzer (*PerkinElmer Nitrogen Analyzer 2410 serie II*), where a combustion at 900°C was applied to release nitrogen from the samples. Estimated by the thermal conductivity detector, the percentage of nitrogen is converted into protein equivalent by using appropriate correction factor for plant biomass through the following formula:

$$\text{Proteins (mg / g of sample)} = \% \text{ Nitrogen} \times 62.5$$

3.3.3 *Neutrophils viability assays.*

Neutrophils were obtained from fresh citrate anticoagulated venous blood of healthy volunteers. The procedures were performed under the guidelines of the research ethical committee of the 'Centre hospitalier universitaire de Québec' and in compliance with the Helsinki's declaration.

3.3.3.1. Human Neutrophil preparation.

Isolation of human neutrophils was performed as described in our previous work (Meda, Poubelle, et al., 2017). Briefly, after elimination of platelets and erythrocytes from the whole blood by centrifugation and differential sedimentation with dextran respectively, granulocytes were separated from monocytes and lymphocytes by gradient centrifugation over a Ficoll-Paque cushion. Collected at the bottom, neutrophils were cleaned from contaminating erythrocytes through lysis in hypotonic solution and re-suspended at $10 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI 1640 medium supplemented with FBS, HEPES, and antibiotics for assays.

3.3.3.2. Treatment of neutrophils and apoptosis assessment with flow cytometer

The details on the design of samples are brought in the following sub-sections. These samples were solubilized in 10% DMSO-water mixture and filter sterilized ($0.22 \mu\text{m}$) prior to addition to the culture media. Five microliter of each tested sample was introduced in $100 \mu\text{L}$ of the cell suspension neutrophils and incubated for 24 h at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. At the end of incubation time, cells were washed and apoptosis was analyzed by double staining with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) using FACSCalibur flow cytometer and Cell Quest Pro software (BD) as described previously by Meda et al., (2017b)

➤ *Treatment with fractions and pure compounds from bud extracts*

Residual solvent of fractions (EAF, BF and RWF) was first checked according to the requirements of International Conference on Harmonisation for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [ICH] described by Hu et Liu (2011) in order to provide the best control design ($0 \mu\text{g} / \text{mL}$) for cell assays. Established by these guidelines, ethyl acetate and butanol remaining in fractions were found to be lower than 0.5 % (5000 ppm) according to the loss on drying method. Thus, this reference limit value was used to prepare control sample in 10% DMSO-water mixture for fractions. The samples, RMB-hwe (also called crude extract), EAF, BF and RWF were then assessed each at increasing final concentrations of 10, 50, 100, 200 and $300 \mu\text{g} / \text{mL}$. Purified as major phenolic constituent of RMB-hwe and its fractions, gallic acid (GA), ginnalin A (Gin A), ginnalin B (Gin B), ginnalin C (Gin C) and ginnalin 3,6 (Gin3,6) were also dissolved in 10% DMSO-water mixture and tested at 1, 5, 10, 50, and $100 \mu\text{M}$.

➤ *Assessment of combined effect of active ACGs*

Equimolar mixtures of active ACGs reflecting their associations in RMB-hwe and fractions were performed in order to understand in more details their effect on human neutrophil viability. The mixture 1 (Gin A: Gin 3,6), the mixture 2 (Gin A: Gin C) and the mixture 3 (Gin A: Gin 3,6: Gin C) were prepared and tested at concentration ranges identical to those used for the sole compounds, i.e 1, 5, 10, 50, and $100 \mu\text{M}$ each. For concentrations of mixtures that presented significant difference of the percentage of apoptotic cells comparatively to control, the percentage of apoptosis induction ($\% \text{ AI} = [\% \text{ assays} - \% \text{ control}] / \% \text{ control}$) were determined. For mixtures and compounds alone, this percentage was used for combination study according to Chou-Talalay method based on the mass-action law (Chou, 2010). The combination index (CI) which evaluates the interaction between molecules in mixture was calculated using CompuSyn software (ComboSyn,

Inc., Paramus, NJ) which is available at <http://www.combosyn.com/feature.html>. The evaluation criteria were the following $CI < 0.8$ means synergistic effect, $0.8 < CI < 1.2$ additive effect, and $CI > 1.2$ suggested antagonistic as described by Bijnsdorp et al., (2011).

3.3.4 Statistical Analysis

All experiments were performed in at least three independent assays and results are expressed as mean \pm Standard Error of Mean (SEM). Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test and the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison post-test, as appropriated using GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). P-values below 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.001 (***) were considered as significant.

3.4 Results

3.4.1 Effects of RMB-hwe and its fractions on the viability of human neutrophils

The proportion of dying cells according to their state were assessed for treated cells comparatively to controls and the effects of these samples on neutrophils viability are presented on **figure 3.14**. Data from FACS analysis show that EAF and BF significantly decreased the proportion of viable cells approximately from 25 to 10% when treatment were performed at concentrations between 50 and 200 $\mu\text{g/mL}$. Surprisingly crude extract and RWE increased this proportion comparatively to control (25 to 40 %) at 200 and 300 $\mu\text{g/mL}$. Even if the number of cells at early apoptotic stage dose-dependently tumble down for all treatments (60 % for the control to 25% for the highest concentrations), the drop is faster for EAF which causes significant decrease of cell proportion already at 100 $\mu\text{g/mL}$. The other assays were significantly different from control only from 200 $\mu\text{g/mL}$. Comparatively to the control, the exposure to increasing doses of RMB-hwe and fractions, increases the rate of late apoptotic cells until more than 2.5-fold (20% to 55%), especially for EAF. Here also, this fraction caused significant growth of apoptotic cells already concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ and far exceeded those of the others fraction at the higher concentrations. Crude extract and butanol fraction furnished significant response at 100 $\mu\text{g/mL}$ while remaining water extract was only effective at 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Finally, for all treatments and concentrations tested, no significant differences were observed for the percentage of necrotic neutrophils (less than 4%) comparatively to the control. So, the RMB-hwe and its fractions did not induce any apparent toxicity below the concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.2 Phytochemical analysis of enriched-fractions from RMB-hwe

In the light of results obtained for apoptosis assays, a phytochemical screenings of enriched fractions derived from RMB-hwe were performed and the results are summarized in **table 3.9**. Ethyl acetate and butanol displayed enhanced content of phenolic compounds that represented almost the half of these fractions (449.1 $\text{mg/g} \pm 6.8$ and 447.3 $\text{mg/g} \pm 7.8$, respectively). Surprisingly the quantity of phenolic compounds for these fractions were not significantly different. Conversely, the remaining water fraction impoverished in phenolic

compounds was found to be concentrated in sugars and proteins (around 3-folds for sugars one and 1.5 for proteins).

For fractions from RMB-hwe, the variation of the amount as regards the main ACGs was presented in **figure 3.15**. Gallic acid and its derivatives are proportionally represented on pie graphs as their amounts in the various samples. Ginnalin A which is the predominant gallotannin of RMB-hwe (11.7% m/m of dry extract) as well as also for EAF (21.7% m/m of fraction) and BF (18.3% m/m of fraction). However, the other compounds showed distinctive repartition between fractions. Indeed, ginnalin 3,6 was concentrated in EAF (up to 6.2% m/m in the fraction) while it was absolutely absent from BF fraction. The proportions of ginnalin C in BF (15.7% m/m) are 2 and 3-fold superior in RMB-hwe and in BF, respectively. This compound was also the main phenolic constituent of RWF (4.6% m/m of the fraction). Lastly, gallic acid (1% m/m of dry RMB-hwe) is concentrated in EAF (3 % m/m) whereas ginnalin B (3.1% m/m of dry RMB-hwe) was in BF (7.6 % m/m).

3.4.3 Some of the major ACGs induced apoptosis of neutrophils at high concentration.

In order to provide evidences that the pro-apoptotic effects of crude extract and fractions could be attributed to the major maple gallotannins and variations of their amount, these compounds were assessed on human neutrophils. A dose-dependent apoptotic effects of gallic acid, ginnalin A-C and ginnalin 3,6 was tested up to 100 μ M. The results showed that effects on all states of neutrophils viability were not significantly different for any tested compounds until 50 μ M compared to control (DMSO at final concentration of 0.5%). Nevertheless, the only highest dose of 100 μ M caused modest decrease of the percentage of viable cells for neutrophils treated with gallic acid and ginnalin C, while when tested ginnalin C, ginnalin A and ginnalin 3,6 demonstrated high significant pro-apoptotic effect (**Figure 3.16**). Specifically, gallic acid and gin C reduced the proportion of viable cells of 18 % and 10 %, respectively comparatively to control. Concerning the pro-apoptotic effects, gin A, gin C and gin 3,6 seemed to speed up early apoptotic cells to the stage of late apoptotic cells, without any trigger of significant necrosis (below 1% for all treatments). So, compared to control, the numbers of late apoptosis was increased by 40% for neutrophils treated with ginnalin A at 100 μ M. Increases of 25% and 20% were observed for neutrophils processed with ginnalin 3,6 and ginnalin C, respectively.

3.4.4 Effect of equimolar mixtures of active maple gallotannins on neutrophil apoptosis.

For better understanding of the pro-apoptotic effects of RMB-hwe and its fractions, equimolar mixtures of these active compounds were assessed. The **figure 3.17-A** reports dose-response outcomes obtained for mixture 1 (Gin A: Gin 3,6), mixture 2 (Gin A: Gin C) and mixture 3 (Gin A: Gin 3,6: Gin C). Unlike the treatments with pure compounds, neutrophils treated with cited mixtures have undergone to apoptosis at significantly higher rates than control cells, already at 50 μ M (concentration of each compound in mixture). Combination of active ACGs strengthened significantly the pro-apoptosis effects on neutrophils suggesting additive effects of these compounds at this concentration relative to CI value obtained for these combinations (1.2 for mixture 1, 0.8 for mixture 2 and 0.9 for mixture 3).

However, depending on compounds used in mixture, the pro-apoptotic responses were different when compounds were at high 100 μM each. Indeed, equimolar mixture of ginnalin A and ginnalin 3,6 at 100 μM each (**figure 3.17-A1**) resulted on significant increase of pro-apoptotic effect (50.1%) comparatively to 50 μM concentration (37.4%). This effect also resulted on the additive effect of these active ACGs (CI value of 1.2). In contrast, where ginnalin C where a part of these associations, the pro-apoptotic effects at 100 μM of each were not significantly different to 50 μM for mixture 2 (**figure 3.17-A2**) and even seemed to decrease significantly for mixture 3 (**figure 3.17-A3**). These observations were confirmed to be an antagonist effect of ginnalin C at 100 μM by CI values of 1.7 and 2.5 for mixture 2 and 3, respectively. Finally, the individual potencies of the active ACGs established until 200 μM and expressed in term of percentage of apoptosis induction (**Figure 3.17-B**) revealed an early steady state for the sigmoidal dose-effect curve of ginnalin C from 100 μM (**Figure 3.17-B3**).

3.5 Discussion

The programmed cell death or apoptosis, is a vital component of normal cell turnover. Inappropriate or dysregulation of apoptosis (either too low or too excessive) is involved in the development of a large number of human pathologies including cancers and autoimmune disorders. The ability to modulate the life or death of cells is recognized for its immense therapeutic potential (Elmore, 2007; Portt, Norman, Clapp, Greenwood et Greenwood, 2011). Neutrophils apoptosis is fundamental for the resolution of inflammation because neutrophils undergoing death are downregulated with impaired chemotaxis, respiratory burst, and degranulation. (Luo et Loison, 2008)

We report in this work for the first time, that anhydroglucitol-core gallotannins (ACGs) from red maple buds are able to induce pro-apoptotic effect on human neutrophils, major components of immune system. Indeed, the effect assessment of major ACGs isolated from the hot water extract of red maple (*Acer rubrum* L.) buds showed that Gin A, Gin C and Gin 3,6 significantly increase the rate of late apoptotic neutrophils at 100 μM . These findings are in line with previous data described in literature. Phenolic compounds are able to modulate neutrophils viability (Jančinová, Perečko, Harmatha, Nosál' et Drábiková, 2012). These compounds were also reported to induce apoptosis at high doses especially in the case of cancer cells. Similar effects were reported for curcumin (Radhakrishna Pillai, Srivastava, Hassanein, Chauhan et Carrier, 2004), Ellagic acid (Salimi et al., 2015) or gallic acid (B. C. Ji et al., 2009). Also, previous knowledge on the biological properties of ACGs indicated that some of them are capable to induce antiproliferative, cell cycle arrest and apoptosis on some cancer cells. González-Sarrías et al., (2013) reported a slight increase in the number of apoptotic cells after 72 h treatment of colon and breast cancer cells with ginnalin A at 50 μM . In this study, we determined nearly 40 % of apoptosis increase after 24 h treatment with ginnalin A at 100 μM , but on neutrophils, non-proliferative and short life-span cells. Also, planned contrast on the pro-apoptotic effects of the assessed ACGs on neutrophils led to a structure-activity relationship (SAR) similar to that previously described by González-Sarrías et al., (2012b). In fact, careful observation of the structures of tested maple gallotannins clearly reveals that they differed by the number and location of galloyl moiety linked to the sugar, a 1,5-anhydro-glucitol. The Gin B-C were galloyl esters at position 6 and 2, respectively while Gin A (2 and 6 galloyl derivatives) and its

isomer Gin 3,6 contain double galloyl each. It seems that one galloyl linked to glucitol core at position 2 results in more but not significant pro-apoptotic effect than the position 6 ($p=0.1583$). Also, anhydroglucitol bonded to two galloyl moieties (position 2 and 6 as in ginnalin A) seemed to increase significantly the pro-apoptotic activities of maple galloannins comparatively to the substitution at only position 2 ($p=0.0153$) or 6 ($p=0.0143$). Finally, for double galloyl moieties on the anhydroglucitol, position 2 and 6 was more efficient than its isomer with substitutional 3 and 6 ($p=0.0044$). This SAR is in accordance with data reported in literature where the number of substitution (in particular double) and the location of galloyl groups linked to 1,5-anhydro-glucitol core provided better biological activities (antioxidant potential, anti-proliferative and α -glucosidase inhibition) (González-Sarrías, Yuan, et al., 2012; H. Ma et al., 2015; H. Ma, Liu, et al., 2016; Wan, Yuan, Li, et al., 2012). Finally, galloylation was previously reported to affect the physico-chemical properties of phenolic compounds such as lipophilicity and electrons donation that can lead to higher biological activity (Karas, Ulrichová et Valentová, 2017). In view of all this, the ability to speed up human neutrophils apoptosis can be now attributed to some ACGs.

The fractions of RMB-hwe were obtained from solvents partitioning with ethyl acetate and butanol. These solvents of low toxicity and lower risk for human health (class 3) are known and commonly used for their suitability to provided phenolic-enriched fractions from plant sources (Meda, Fraise, et al., 2017). Despite on similar concentration of total phenolic content and equivalent active ACGs (33 and 34 % m/m For EAF and BF, respectively), the effects of these samples on neutrophils apoptosis were different. Indeed, at the top of their pro-apoptotic effect, EAF approximately induce 2-fold more apoptosis than BF. At this concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, Gin A, Gin 3,6 and Gin C were at 92.6 μM , 26.3 μM and 32.2 μM , respectively in EAF. BF was composed by Gin A (78.3 μM) and Gin C (99.3 μM). In order to bring more light on this phenomenon, we performed an explorative study of the effect of the combination of active ACGs on neutrophils apoptosis. Drug combination analysis is complex and goes beyond simple statistical issue (with p-values). Therefore, various theories and programs have been developed for such studies. The Combination Index (CI) introduced by Chou and Talalay and derived from the “mass-action law” principle is one of the most widely used methods to evaluate whether a combination is effective (Bijnsdorp et al., 2011; Chou, 2010). This explorative study presented here on the effect of treatments combining active ACGs revealed for the first time an additive effect of these compounds on biological system. These outcome are in accordance with the additive effect suggested by Geoffroy et al., (2017) during the assessment of the antioxidant potential of ACGs form red maple bark extract by spiking DPPH experiments. The results of our study also demonstrated for the first time, an antagonist effect of Gin C in mixture when present at high concentration, probably due to the steady state early exhibited by sigmoidal dose-effect curve of Gin C at 100 μM . These finding provides additional explanation of the low pro-apoptotic effect of BF in which this compound is present at high concentration. Interaction of polyphenols in antioxidant activities has been a subject of many studies as example of green tea (Colon et Nerín, 2016) or food mixtures (S. Wang, Meckling, Marcone, Kakuda et Tsao, 2011). Also, ellagic acid, quercetin, and resveratrol have been reported to synergistically induce apoptosis of human leukemia cells (Mertens-Talcott et Percival, 2005). The interactions between components of mixtures represent a vital part of phytomedecines and

phytotherapy, the therapeutic efficacy of which, at apparently low doses of active constituents or the low toxicity, explained on the combined action of mixtures (Williamson, 2001). For a long time, the challenge of studying synergism phenomenon creates a great scepticism around this form of therapy. The frustration resulting from the loss of biological activities of some purified compounds and the multi-target therapeutic concept extolled by combining active phytochemicals in the case of cancer and infections multidrug resistance, have significantly contributed to reconsidered combined approach (Efferth et Koch, 2011). Thus Ginkgolide mixtures from *Ginkgo biloba*, phenolic compounds (hypericin, hyperforin, flavonoids, and procyanidins) mixtures from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) or the association of artemisinin from *Artemisia annua* with mefloquine, lumefantrine or tetracycline for the treatment of malaria are the many examples of mixtures applications in modern medicine (Hildebert Wagner, 2011). The exiting findings of this research on interaction between maple gallotannins in mixtures may affect several fields of application either in order to enhance their pro-apoptotic effect or to mitigate it in order to promote others biological proprieties as antioxidant activities or antiglycation effects.

Meanwhile, the pathways by which these compounds lead to accelerate the human neutrophil apoptosis have to be elucidate out for the better evaluation of their potential in particular in chronic inflammatory diseases in which immune cells are implicated. Considering that the phagocytosis of apoptotic neutrophils stimulate macrophage polarization into M2 phenotype which orchestrates resolution and tissue repair by inducing the production of anti-inflammatory cytokines (El Kebir et Filep, 2013), the ability of maple gallotannins to promote these effects could be assessed *in vitro* as well as *in vivo*. Finally, the immunomodulatory activities could be related to water soluble polysaccharides from plant extract (Z. E. Chen et al., 2017; M. Wang et al., 2017). Therefore to further study the increase of the proportion of viable neutrophils determined following the treatment with the remaining water fraction (consisting mainly of polysaccharides and proteins), additional experiments should be performed. This could point to other potential applications for hot water extract from red maple buds.

3.6 Conclusion

We report in the present study the evidence that maple gallotannins, the major phenolic compounds of hot water extract from red maple buds are involved in the pro-apoptotic effect of human neutrophils. Indeed, assays performed with major compounds revealed that Ginnalin A, ginnalin 3,6 and ginnalin C were the most active compounds which caused significant acceleration of neutrophils apoptosis at 100 μ M. Enriched polyphenolic fractions produced from RMB-hwe show different pro-apoptotic effects which could be directly linked to the additive and antagonist effects of their active ACGs constituents. The molecular mechanism of action by which these compounds lead to neutrophils apoptosis is part of our ongoing research and might confirm their potential as an interesting approach for the resolution of chronic inflammatory process.

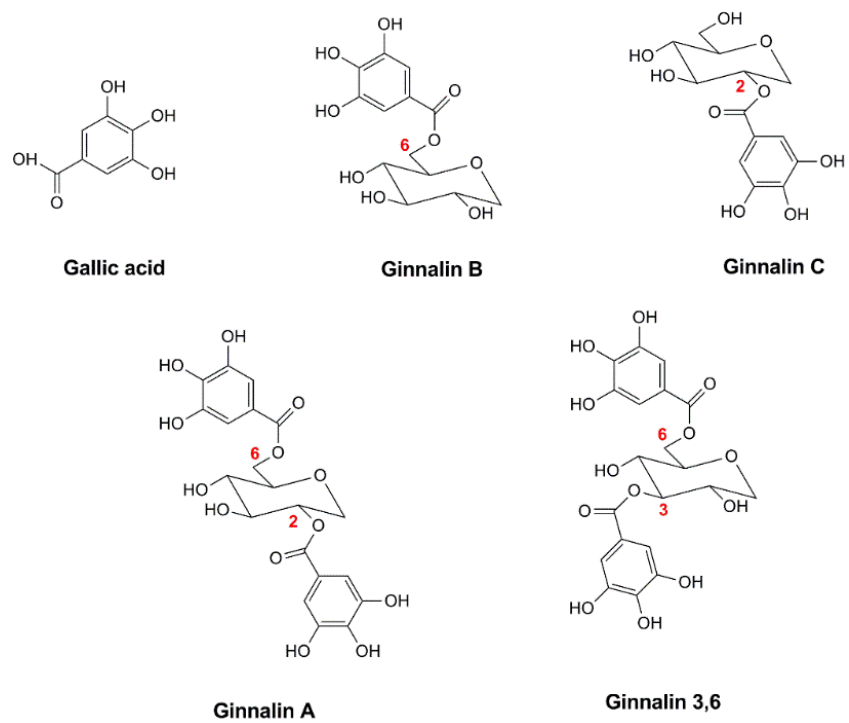
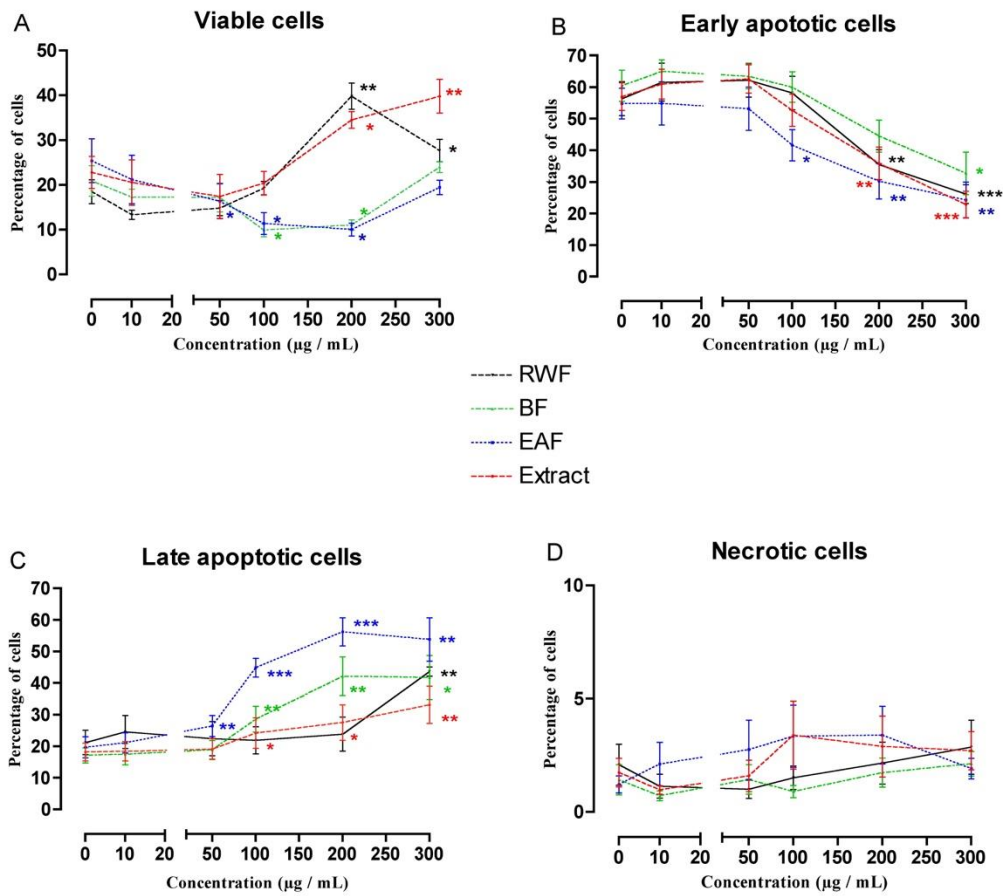
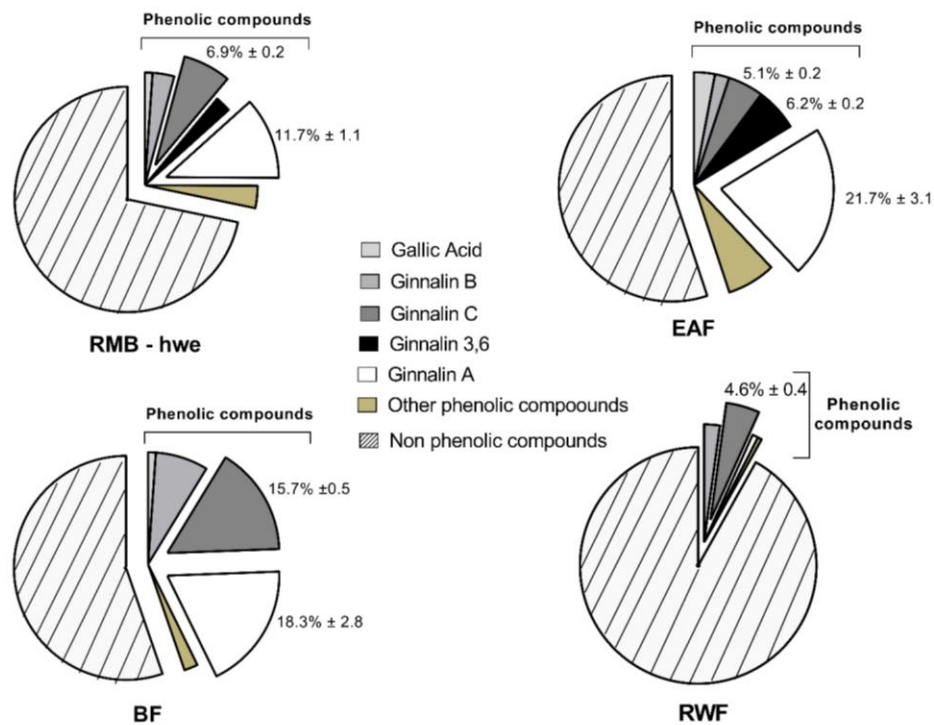


Figure 3.13: The structure of five most abundant phenolic constituents of hot water extract from red maple extract.



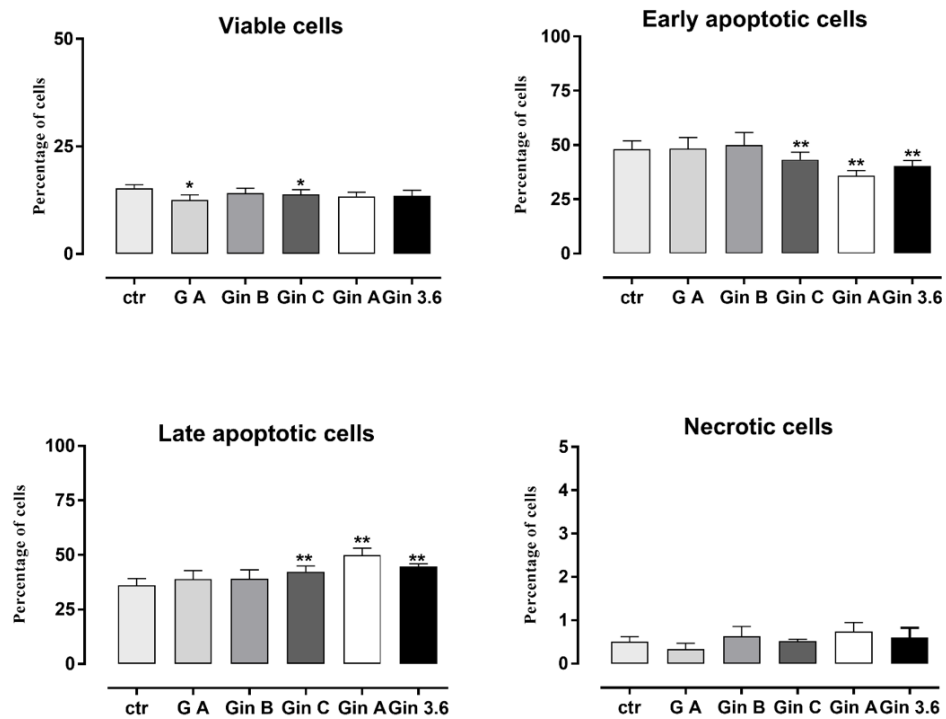
Neutrophils were incubated with control (0) or graded concentrations of fractions (10, 50, 100, 200 and 300 µg/mL) for 24 hrs. Ethyl acetate fraction (EAF), butanol fraction (BF) and remaining water fraction (RWF). Results are expressed as means ± SEM for n = 5 different donors. Statistical differences between treated cells and control cells (treated with vehicle) were obtained by a one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (Ctr vs. Treated) and significance was set at $P < 0.05$ (* significant, ** high significant, *** very highly significant).

Figure 3.14: Dose-response effect of red maple buds hot water extract (RMB-hwe) and its fractions on neutrophil viability.



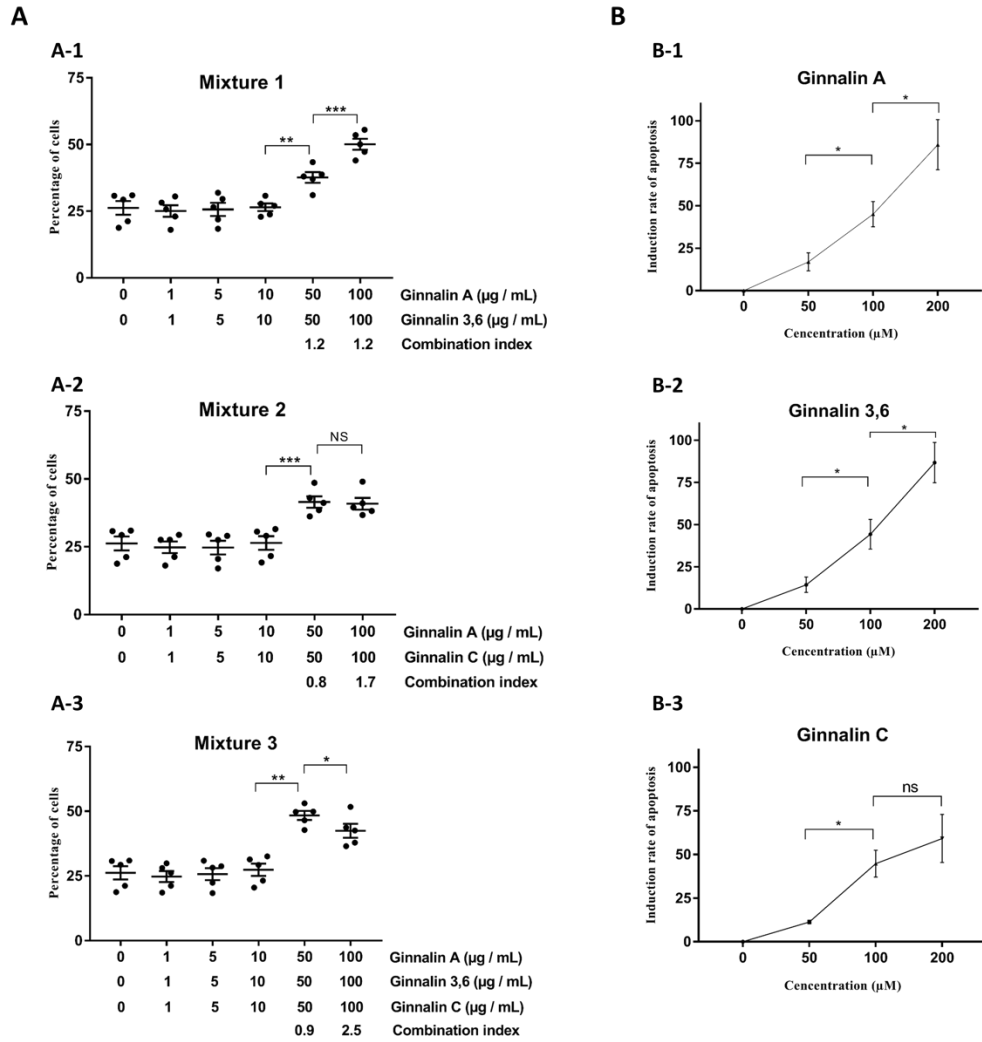
Concentrations of main gallotanins were expressed for red maple buds hot water extract (RMB-hwe) and fractions. Values are means \pm SEM for $n = 3$ and represented proportionally on pie graphs as their amounts were in the various samples, ethyl acetate fraction (EAF), butanol fraction (BF) and remaining water fraction (RWF).

Figure 3.15: Phytochemical screening of fractions derived from RMB-hwe



Neutrophils were incubated with control (0) or graded concentrations of pure compounds at 100 μ M for 24 h. Results represent the means \pm SEM for 5 different donors. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (Ctr vs. Treated) and significance was set at $P < 0.05$ (* significant, ** high significant).

Figure 3.16: Pro-apoptotic effect of major gallotannins from red maple buds hot water extract (RMB-hwe) and its fractions on human neutrophils.



A- Dose-dependent effect of mixtures of gallotannins on the rate of late apoptotic neutrophils

Results represent the means \pm SEM for 5 different donors. Combination index (CI) which evaluates the interaction between molecules in mixture was calculated for concentrations of mixtures that presented significant difference of the percentage of apoptotic cells comparatively to control, using CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ) The evaluation criterions were $CI < 0.8$ means synergistic effect, $0.8 < CI < 1.2$ additive effect, and $CI > 1.2$ suggested antagonistic as described

B- Dose-dependent effect major of pure gallotannins on the rate of late apoptotic neutrophils.

The percentage of apoptosis induction were expressed for active compounds to determine their potencies. Results represent the means \pm SEM for 4 different donors. Statistical differences between groups were compared by paired Student t test and significance was set at $P < 0.05$ (* significant and ns = non-significant).

Figure 3.17: Effect of the constant ratio combination of ginnalin A, ginnalin 3,6 and ginnalin C on neutrophils viability

Table 3.9: Quantification of main phyto-constituents of red maple buds hot water crude extract and its fractions

	Total phenolic content ¹	Total sugars ²	Proteins ³
C. extract	282.3 ± 5.3 ^b	242.3 ± 7.9 ^b	45.5 ± 1.5 ^b
E. A. Fraction	449.1 ± 6.8 ^a	32.3 ± 0.8 ^d	6.1 ± 0.0 ^d
B. Fraction	447.3 ± 7.8 ^a	94.0 ± 3.3 ^c	21.6 ± 1.2 ^c
R. W. Fraction	81.1 ± 1.9 ^c	859.5 ± 4.9 ^a	72.1 ± 0.4 ^a

Main phyto-constituent of crude extract and fractions were expressed as the mean of tree assays ± SEM (Standard error of mean). For each class of phytochemicals, samples were compared through one-way ANOVA followed by Fisher multiple comparison test. Means without a common letter are statically different ($P < 0.05$). ¹ Expressed in mg/g of samples by summing amount of individual phenolic compounds of sample determined by HPLC quantification. ² Total sugars content expressed in GRAFE/g (Galactose Rhamnose Arabinose Fructose Equivalent). ³ Proteins expressed in mg/g of samples based on total nitrogen content.

4. Contributions majeures à l'amélioration des connaissances

1- Nous avons prouvé pour la première fois que des gallotannins pouvaient induire une apoptose de cellules immunitaires.

2- Nous avons démontré pour la première fois que la ginnalin C pouvait moduler l'effet pro-apoptotique en fonction de sa concentration dans un mélange de gallotanins de l'érable.

**QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION / CONCLUSION/
PERSPECTIVE**

“Tout est poison, et rien n’est sans poison ; ce qui fait le poison c’est la dose.”

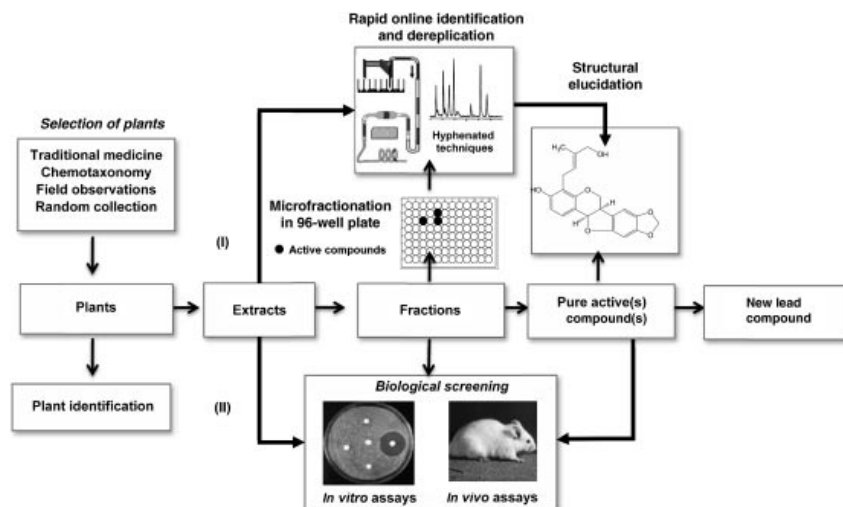
Paracelse

DISCUSSION GÉNÉRALE

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, les plantes produisent une grande quantité de métabolites. L'extraction permet le transfert d'une ou de plusieurs composantes de la matrice vers un fluide qui sera éliminé par la suite pour fournir des extractibles. Il s'agit de la méthode ancestrale utilisée pour récupérer ces métabolites d'intérêt (Lloyd et Wyk, 2011). Pour notre étude, les extractibles des bourgeons d'érable solubles dans l'eau chaude et ceux solubles dans l'éthanol 95% (v/v) ont ainsi été évalués. Respectueux de l'environnement et de faible toxicité, ces deux solvants sont classés parmi ceux admis par la FDA pour des applications agroalimentaires et pharmaceutiques (Palma et al., 2013).

Sur les extraits obtenus, plusieurs approches sont décrites dans la littérature pour examiner leur potentiel. Les approches chimio-guidées et bio-guidées sont les plus populaires. La première approche consiste à mettre en évidence dans les extraits, des familles de molécules ou des structures chimiques connues pour présenter un grand intérêt. Dans ce cas, c'est la nature chimique des constituants du mélange qui est mise en avant. Dans le deuxième cas, des propriétés sont recherchés sur des systèmes biologiques afin de détecter des effets généraux ou spécifiques (par exemple, antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, anti-VIH, antidiabétiques, etc.) d'un extrait brut, d'une fraction enrichie, d'un mélange ou d'un composé pur. Ces tests d'activités biologiques peuvent se dérouler *in vitro* sur des micro-organismes, des constituants cellulaires (enzymes, récepteurs) ou des cellules, *ex vivo* sur des tissus et organes isolés, ou même *in vivo* dans des organismes vivants entiers (Molyneux et Colegate, 2007). Il est évident que cette dernière approche, surtout lorsqu'elle est réalisée *in vivo*, est plus pertinente pour prédire des effets au niveau de l'homme. Par contre, le principal inconvénient de ces études reste leur coût de plus en plus exorbitant, mais à cela se rajoute également le besoin d'une grande quantité de composés / fractions d'essai (parfois difficile à obtenir pour des composés naturels) et leur conception souvent très complexe à mettre en place (Sarker et Nahar, 2012a).

Pour les explorations chimiques et biologiques, des extraits produits à partir de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge, nous avons adopté une démarche qui combine les deux approches précédemment évoquées et résumées par la **figure 4.1** proposée par Queiroz, Hostettmann, et Wolfender (2012). En somme, sur ces extraits, des criblages chimio-guidés (qualitatifs et quantitatifs) et des tests d'activité générale (antioxydante et viabilité cellulaire) ont permis de retenir les échantillons les plus prometteurs pour la poursuite des explorations bio-guidées. Des déréplications chimiques (I) et des fractionnements bio-guidés utilisant des essais cellulaires *in vitro* (plus rapides et moins coûteux) (II) ont été réalisés simultanément sur ces échantillons et ont permis de proposer plusieurs voies de valorisation pour les produits naturels issus de bourgeons d'érable.



Adapté de Queiroz, Hostettmann, et Wolfender (2012) avec permission de l'éditeur

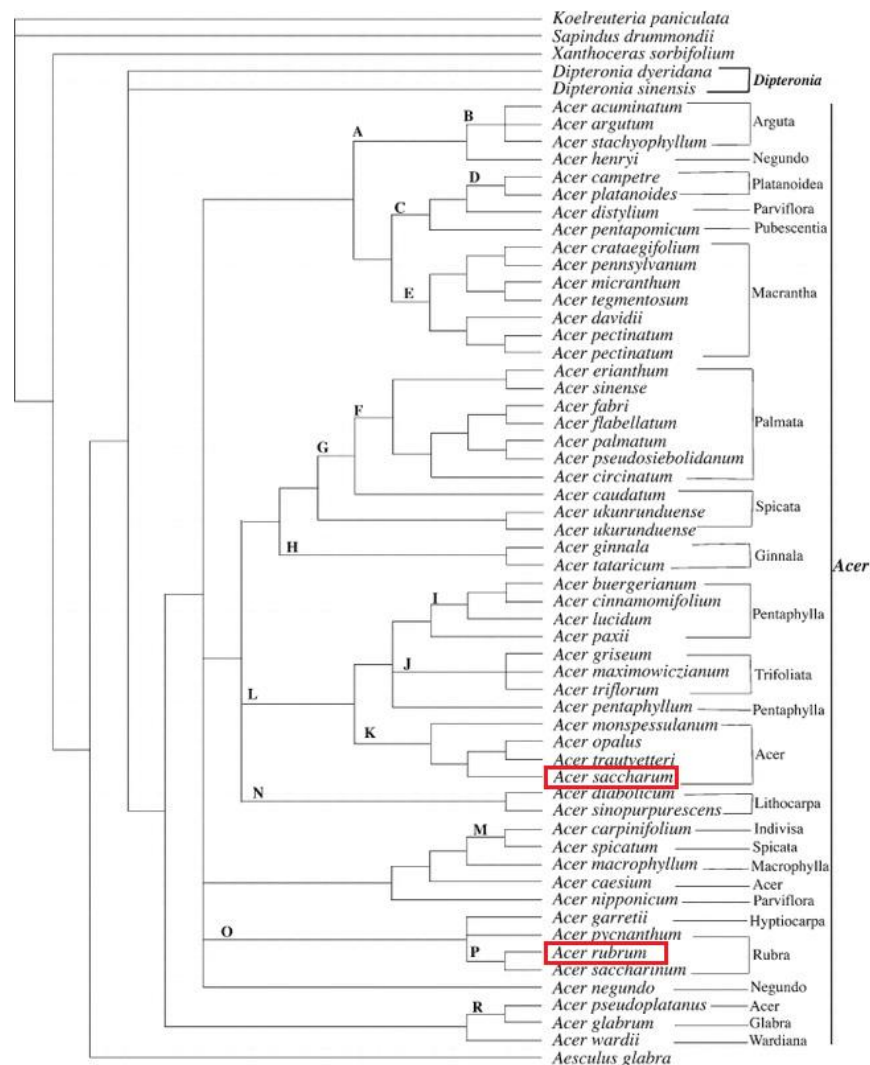
Figure 4.1 : Aperçu de la démarche de recherche de molécules bioactives à partir de plante.

1. Des potentiels de valorisation différents pour les extraits de bourgeons de ces deux essences

Pour le criblage des principales familles chimiques contenues dans les extraits de bourgeons d'érable, nous avons opté pour une méthode associant une technique de séparation. C'est ainsi que la chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à des dérivations par des révélateurs a été choisie pour notre étude. Malgré de faibles capacités dans la performance des séparations comparativement aux techniques récentes d'analyse (type HPLC), la CCM présente l'avantage d'être très simple, rapide, peu coûteuse, et permet de visualiser la plupart des familles chimiques rencontrées dans les végétaux. Dans les conditions optimales de séparation, cette technique de criblage présente également l'avantage de fournir une empreinte chimique de l'échantillon testé. Cette empreinte qui servira de marque d'identité et de contrôle de qualité lors de prochains travaux. De ce fait, cette méthode représente la première approche dans l'investigation de la composition chimique pour l'édification de monographies dans la plupart des pharmacopées (Skalicka-Woniak et al., 2008).

Cette exploration chimique qualitative par CCM des extraits aqueux de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge a montré que ces deux essences présentaient les mêmes familles de produits naturels. L'appartenance de ces deux espèces au genre *Acer*, qui découle des caractéristiques génétiques qu'elles partagent pourrait expliquer les résultats obtenus. En effet, la biosynthèse des métabolites contenus dans les organismes est essentiellement régie par une multitude d'enzymes dont la structure et les fonctionnalités découlent directement du code génétique des organismes. Ainsi, au sein d'un taxon, qui regroupe des individus génétiquement proches, il est normal qu'une similarité dans les groupes de métabolites produits soit observée pour ces deux extraits provenant d'espèces du même genre. C'est d'ailleurs sur ce principe que se base la chimiotaxonomie (Pietra, 2002).

Par contre, en observant de plus près l'organisation des espèces au sein du genre *Acer* (**Figure 4.2**), des subdivisions en sections et séries sont observées sur la base de caractères morphologiques, anatomiques et chimiques par divers auteurs. Ainsi, sur la base des séquences non codantes des régions les plus variables du génome chloroplastique des érables, l'érable à sucre est logé dans la section des *Saccharina* (*Acer*) bien distinct des *Rubra* à laquelle appartient l'érable rouge (J. Li, Yue et Shoup, 2006). Certains auteurs suggèrent que les érables du groupe *Rubra* partageraient plusieurs caractéristiques avec les espèces de la section *Ginnala*. Les résultats de notre étude confortent cette hypothèse car des analyses phytochimiques réalisées sur l'érable de Tartarie (*Acer tataricum*), une espèce de la section *Ginnala* a révélé une composition chimique très similaire. Les composés phénoliques majoritaires de l'extrait aqueux de cette essence étaient les mêmes que ceux retrouvés dans notre étude, c'est-à-dire l'acide gallique, la Ginnaline B, la Ginnaline C, la ginnaline 3,6 (3,6-di-O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol) et la Ginnaline A (Bi, Shen, et al., 2016). En somme, notre étude met encore une fois en exergue un rapprochement entre ces deux groupes du genre *Acer*.



Adapté de J. Li, Yue, et Shoup (2006) avec permission de l'éditeur

Figure 4.2 : Organisation phylogénétique des érables.

Ainsi, les diversités chimiques et les teneurs observées au sein des familles chimiques mises en évidence dans les extraits de ces deux érables pourraient donc être expliquées par leur appartenance à des sous-groupes différents. Cette biodiversité, soulignée encore une fois dans les résultats de notre étude laisse donc envisager au final des voies de valorisation différentes pour des extraits provenant des bourgeons des érables. En résumé, les extraits de bourgeons d'érable rouge (RMB) ont montré de fortes teneurs en composés phénoliques alors que ceux d'érable à sucre (SMB) ont plus présenté une diversité chimique majeure. En se basant sur les résultats de la quantification, les extraits obtenus à partir de SMB semblent contenir des polysaccharides et des protéines différentes de ceux de RMB dont l'intérêt de valorisation devra être prouvé par des études complémentaires.

2. L'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge et sa fraction butanol : des antioxydants naturels riches en gallotanins.

2.1 Composition chimique et propriétés biologiques des antioxydants contenus dans les produits naturels issus d'extraits de bourgeons.

Les analyses chimiques réalisées sur l'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge (45% de rendement) ont montré que ces composés phénoliques se composaient essentiellement de gallotanins, mais également de flavonoïdes et d'anthocyanes. Les tannins hydrolysables (gallotanins et éllagitanins) constituent, avec les tannins condensés, une catégorie de composés phénoliques solubles dans l'eau. Les gallotanins présentent une structure chimique de base composée d'une unité glucidique ou d'acide quinique, estérifiée par des groupements d'acide gallique (Okuda et Ito, 2011). Les érables ont la particularité de contenir des gallotanins caractéristiques dont le dérivé glucidique est un anhydroglucitol. Ces composés représentent plus de 25% (m/m) de l'extrait à l'eau chaude et près de 45% (m/m) de la fraction butanol.

Outre les composés phénoliques, des dérivés glucidiques et d'acides aminés ont également été mis en évidence dans ces extraits aqueux des bourgeons d'érable. Les teneurs en dérivés glucidiques sont de 24% et 9% (exprimé en équivalent Galactose Rhamnose Arabinose et Fructose) respectivement pour l'extrait aqueux et la fraction butanol. Elles sont à hauteur de 5% et 2% pour les dérivés d'acides aminés (sur la base d'azote total).

De façon générale, les gallotanins présentent de nombreuses propriétés biologiques. Ces propriétés découlent souvent de deux caractères physico-chimiques fondamentaux que ces composés partagent avec les autres composés phénoliques. Il s'agit de leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à participer à des processus de complexation avec des macromolécules, comme des protéines et des polysaccharides. L'activité antioxydante est généralement considérée comme permettant de prévenir les altérations liées à l'âge telles que la cancérogenèse, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires. La complexation avec des biomolécules de cette nature est souvent présentée comme le mécanisme d'action anti-inflammatoire ou à l'origine des différents effets bénéfiques des remèdes à base de plantes à tanins. Ces

molécules naturelles présentent également des propriétés antimicrobiennes notamment antivirales (Herpes HSV1 et 2, VIH) et antibactériennes (*Helicobacter pylori* par exemple). (Erdélyi et al., 2005; Jourdes, Pouységu, Deffieux, Teissedre et Quideau, 2013; Kiss et Piwowarski, 2016)

2.2 Potentiels de valorisation de la capacité antioxydante des produits naturels issus d'extraits de bourgeons.

Les essais menés sur l'extrait aqueux de bourgeons d'érable rouge et sur sa fraction butanol ont montré des propriétés antioxydantes comparables à des standards antioxydants vendus dans le commerce. Les propriétés antioxydantes d'extraits et de molécules d'origine naturelle font l'objet d'un engouement majeur depuis quelques années.

En effet, l'utilisation d'antioxydants dans la protection d'organismes, de tissus, ou de systèmes non-vivants contre l'oxydatif s'est accrue du fait des études réalisées dans divers domaines comprenant la biologie, la médecine, la nutrition et l'ingénierie des aliments. Par exemple, des études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes était associée à un risque réduit de développer certaines maladies chroniques liées à l'âge comme Alzheimer, Parkinson et même le cancer. Ce bénéfice sur la santé humaine est souvent attribué aux antioxydants contenus dans ces aliments. Ils protègent les composants clés de cellules en neutralisant les effets néfastes des radicaux libres produits par leur métabolisme. Aussi, les antioxydants sont largement utilisés pour retarder le processus de la peroxydation des lipides, qui est l'une des principales causes de la détérioration des produits alimentaires et pharmaceutiques pendant la formulation et de stockage. Ils empêchent ainsi le rancissement et autres détériorations d'arôme induites par les processus oxydatifs dans les aliments (Amorati et al., 2013; Gülçin, 2012).

Cependant, ces dernières années, des suspicions de toxicité et de cancérogénèse relevées pour certains antioxydants de synthétiques ont conduit à une réglementation plus stricte de leurs utilisations. Dans ce contexte, les produits naturels apparaissent comme une alternative aux antioxydants synthétiques et un grand engouement est né pour la découverte de nouvelles sources naturelles et sûres, en particulier d'origine végétale.

La tendance croissante des consommateurs à préférer des antioxydants naturels et l'évolution du marché mondial des antioxydants (estimé à plus de 2 milliards USD en 2013) ouvrent le champ à de nouveaux antioxydants différents des préparations classiques contenant de la vitamine E et C. Dans ce contexte, les antioxydants présentés dans notre travail apparaissent donc comme des candidats à de nombreuses valorisations. La capacité de ces produits naturels issus de bourgeons d'érable à ralentir ou réduire les effets néfastes de l'oxydation sur les systèmes concernés (organismes vivants, préparations en agroalimentaire ou cosmétique), devra être prouvée afin de mesurer leur plein potentiel.

2.3 Toxicité d'antioxydants naturels issus d'extraits aqueux de bourgeons d'érable rouge

Les essais de toxicité réalisés en première approche et à titre exploratoire sur les neutrophiles ont révélé une absence de toxicité cellulaire (nécrose) et aucun effet sur les stades de la viabilité cellulaire jusqu'à 100

µg/mL. En effet, l'absence de la ginnalin 3,6 (composé pro-apoptotique majeur de l'extrait) de la fraction butanol permet d'utiliser une fraction deux fois plus riche en gallotanins, jusqu'à 100 µg/mL comme l'extrait de bourgeons et sans toxicité. Par ailleurs, il est primordial de noter qu'*Acer tataricum*, la sous-espèce d'érable du groupe *Ginnala* dont l'extrait aqueux de feuillage présente une composition chimique très similaire à celle de l'érable rouge, est consommé traditionnellement sous forme de boisson en Chine. Connue sous le nom de thé *Ku-jin*, *Gao Cha* ou *Sang-ya Cha*, ce thé est préparé à partir des bourgeons et jeunes feuilles de cet érable qui peuple le Japon, la Corée, l'Est de la Russie, le Nord de la Chine (Lu, Hu et Xia, 2010; Watanabe et Devkota, 2017). La consommation traditionnelle de cet érable ayant une composition similaire pourrait servir de base pour défendre l'absence de toxicité des extraits issus d'érable rouge pour des utilisations à des concentrations similaires (5 à 7% de ginnaline A en fonction des études) (Bi, Shen, et al., 2016). Néanmoins, face aux résultats prometteurs de ces produits naturels issus d'extraits de bourgeons d'érable rouge, des tests de toxicité aiguë et chronique devront être envisagés sur des modèles vivants afin de confirmer la sécurité d'emploi de ces produits naturels pour de nombreuses applications.

3. L'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge comme une source majeur de ginnaline A : Une molécule aux nombreuses applications

3.1 La ginnaline A dans le genre *Acer*

La 2,6-Di-O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol ou Ginnaline A ou Acertannin (**figure 4.3**) est un composé phénolique majeur des érables.

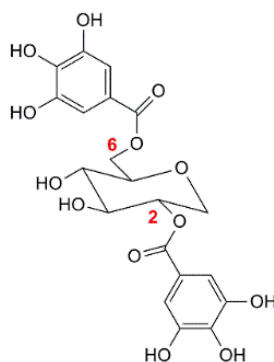


Figure 4.3 : Structure de la ginnaline A

Identifiée pour la première fois dans *Acer ginnala* en 1922 (Bi, Gao, et al., 2016), cette molécule a ensuite été mise en évidence dans *Acer rubrum* (Érable rouge) (H. Ma, Xu, et al., 2017), *Acer pycnanthum* (Ogawa et al., 2011) et *Acer saccharinum* (Érable argenté) (Muhsinah, Ma, DaSilva, Yuan et Seeram, 2017). En ce qui concerne sa teneur dans ces différents organes, très peu de données sont disponibles dans la littérature. Il a été présenté comme le composé majoritaire de l'infusion du thé provenant d'*Acer tataricum* subsp. *Ginnala* à hauteur de 18 % (m/m). Le produit naturel contenant la plus forte teneur en ginnaline A a été rapporté pour une marque déposée au nom de Maplifa™. Il s'agit d'une fraction enrichie sur une colonne de résine à partir

d'un macérât hydro-alcoolique de feuilles d'érable rouge qui contiendrait entre 40-45 % (m/m) de ginnalin A. Dans notre étude, l'extraction par épuisement à l'eau chaude de bourgeon d'érable a fourni 12 % de ginnaline A. Considérant que les bourgeons de notre étude provenaient d'un même site, des études complémentaires devront être réalisées dans le but de conforter cette valeur comme référence dans la récupération de ginnaline A contenue dans les extraits. Le cas échéant, cette molécule pourrait servir de marqueur d'espèce pour l'identification ou le contrôle de préparations à base de bourgeons d'érable rouge car les teneurs en métabolites varient considérablement (nature des sols, conditions climatiques, origines géographiques, période de collection etc...).

3.2 La ginnaline A, une molécule aux nombreuses activités biologiques *in vitro*

De nombreuses propriétés biologiques ont été mises en évidence pour la ginnaline A.

C. Wan et al. (2012) ont montré de bonnes propriétés antioxydantes pour cette molécule (IC_{50} de $17,74 \mu M \pm 0,21$) pour le test anti-radicalaire au DPPH• comparativement à la Vitamine C ($71,02 \mu M \pm 1,61$) et au BHT ($1634,09 \mu M \pm 16,07$) qui sont des antioxydants commerciaux largement utilisés. La ginnaline A est également capable de a également montré sa capacité à réduire la production de peroxyde d'hydrogène dans les mélanocytes (H. Ma, Xu, et al., 2017) et celle de produits de glycation avancée directement liés à la vieillesse (IC_{50} de $30,7 \mu M \pm 0,6$) (H. Ma et al., 2015).

C. Wan et al. (2012) ont également démontré que cette molécule avait une capacité à inhiber l'alpha-glucosidase (IC_{50} de $95,38 \pm 11,65$), une enzyme de la digestion des polysaccharides impliquée dans l'absorption du glucose. Cette activité s'est avérée meilleure que celle du standard utilisé dans la thérapie antidiabétique (Acarbose, IC_{50} de $161,38 \pm 5,5$). La tyrosinase, enzyme impliquée dans la production de mélanine, s'est vue moduler son activité par la ginnaline A (IC_{50} $101,4 \pm 6,5$) (H. Ma, Xu, et al., 2017). Enfin la ginnaline A a présenté la meilleure activité pour arrêter la prolifération de cellules cancéreuses (cancer du côlon, carcinomes, adénocarcinomes et cancer du sein) pour des IC_{50} se situant entre 20 et 30 $\mu g/mL$ (González-Sarrías, Li, et al., 2012; González-Sarrías et al., 2013; Ogawa et al., 2011)

Notre étude a mis en évidence, pour la première fois, la capacité de la ginnaline A à moduler la viabilité de neutrophiles, des cellules majeures de la réponse inflammatoire. Les voies de signalisation moléculaire impliquées dans l'effet pro-apoptotique de cette molécule devront être élucidées afin d'apprécier son potentiel pour réguler la réponse inflammatoire.

Par contre, il est important de noter que toutes ces propriétés biologiques ont été mises en évidence sur des modèles *in vitro*. Des expérimentations *in vivo* et/ou de biodisponibilité devront être envisagées afin de mieux prédire le potentiel de la ginnaline A sur des modèles vivants.

4. La fraction éthyle acétate de bourgeons d'érable rouge: Un concentré de gallotanins capable de moduler la réponse inflammatoire via l'apoptose des neutrophiles.

En plus du stress oxydant, l'inflammation a des sources diverses et variées incluant les infections microbiennes et virales, l'exposition aux allergènes, radiations et toxiques chimiques et les réponses auto-immunes. Comme présenté dans la revue de la littérature, deux types d'inflammation sont décrits : une aiguë et l'autre chronique. Aussi, le rôle des neutrophiles dans cette réponse inflammatoire, surtout dans le cas de sa forme chronique a également été bien documenté dans cette partie.

Nous avons émis l'hypothèse que l'induction de l'apoptose de ces cellules majeures pourrait atténuer la réponse inflammatoire. Dans la littérature, des flavones testées *in vitro* (Lucas et al., 2013) et la curcumine *in vivo* (Jančinová et al., 2011) ont montré des capacités à induire l'apoptose des neutrophiles et ont été proposées comme stratégie thérapeutique visant à induire la résolution de l'inflammation. Les résultats obtenus pour les molécules actives de l'extrait à l'eau chaude de bourgeon d'érable rouge, en particulier ceux de la ginnaline A, s'inscrivent dans cette démarche. Plus encore, alors que la ginnaline A augmentait l'apoptose des neutrophiles d'environ 35% à 100 μ M, la fraction acétate d'éthyle a montré une capacité à doubler l'apoptose spontanée des cellules (+ 100%) pour une concentration en ginnaline A de 90 μ M (20% de la fraction) dans le mélange. Ces résultats saillants, attribués aux effets additifs des autres composantes de la fraction ouvrent le champ à de nombreuses valorisations dans le domaine des maladies inflammatoires.

Cependant, les preuves de cette démarche sur des modèles vivants devront être envisagées. Récemment (novembre 2017) l'infusion de thé *Ku-jin* (*Acer tataricum* subsp. *ginnala*) contenant près de 19% de ginnaline A et très peu de ginnaline C (0.6 %) a montré des effets positifs, notamment sur le profil inflammatoire de rats présentant des lésions du colon (Peng et al., 2017). Ces données confortent notre approche quant au potentiel de cette fraction à moduler la réponse inflammatoire sur des modèles vivants et des expériences complémentaires de cette nature devront être considérées pour l'érable rouge.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons émis l'hypothèse que les bourgeons d'érable à sucre (SMB) et d'érable rouge (RMB) provenant de diverses activités de l'industrie forestière pouvaient être utilisés pour la production d'ingrédients naturels bioactifs pour les domaines de l'agro-alimentaire, des cosmétiques, des nutraceutiques et voir du pharmaceutique.

Sur une matière végétale répondant aux normes de séchage imposées par différentes pharmacopées (taux d'humidité inférieur à 5%) nous avons observé dès la collecte que les érables rouges fournissaient quantitativement 4 fois plus de bourgeons que les plants érables à sucre. Les mesures physicochimiques réalisées sur ces matières végétales ont montré que les bourgeons d'érable à sucre contenaient plus de matières minérales ($5,8 \% \pm 0,2$ contre $3,2\% \pm 0,1$) alors que ceux d'érable rouge fournissaient quel que soit la nature du solvant utilisé pour les extractions, deux fois plus d'extractibles. Les extractions par épuisement de la matière avec de l'eau chaude ont fourni les meilleurs rendements allant jusqu'à plus de 45% dans le cas des bourgeons d'érable rouge.

Les explorations chimiques qualitatives réalisées par chromatographie sur couche mince (CCM) sur les extraits à l'eau chaude et par macération hydro-alcoolique (95 %, v/v) ont révélé que les extractibles de ces deux espèces contenaient les mêmes familles de composés naturels. Il s'agit essentiellement de dérivés d'acides aminés, de dérivés glucidiques et de composés phénoliques. L'approche consistant à utiliser des outils de chimométrie pour comparer les empreintes chimiques des extraits a clairement suggéré des différences tant qualitatives que quantitatives dans la nature des composés phénoliques présents dans les extractibles de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge.

Initiées principalement à travers des dosages spectrophotométriques, les explorations quantitatives ont révélé que les extractibles de SMB étaient plus riches en dérivés d'acides aminés et de glucides, alors que ceux de bourgeons d'érable rouge présentaient une prédominance de composés phénoliques. En ce qui concerne cette dernière classe de métabolites naturels, les analyses en chromatographie ont laissé apparaître que les extractibles de bourgeons d'érable à sucre exprimaient une diversité de composés alors que ceux d'érable rouge privilégiaient la quantité pour certains des composés.

L'étude de la capacité antioxydante des extraits aqueux issus de bourgeons a indiqué que ceux de RMB offraient un meilleur potentiel de piégeage des radicaux libres (test au DPPH) alors que ceux de SMB présentaient plus de potentiel dans la protection de cibles éventuelles de l'oxydation (test ORAC). Les valeurs obtenues pour ces produits naturels issus de bourgeons d'érable étaient globalement du même ordre que celle d'antioxydants commerciaux soulignant ainsi leur potentiel de valorisation en tant qu'antioxydant. En ce qui

concerne les paramètres d'extraction, l'eau chaude s'est révélée être le solvant qui permet d'obtenir les meilleurs résultats aussi bien pour la quantité en composés mais également pour l'activité antioxydante.

Le bilan de cette exploration générale suggère distinctement des potentiels d'application différents pour les extraits issus de bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge. Considérant le potentiel de valorisation et les nombreuses activités biologiques des composés phénoliques, ceux des extraits à l'eau chaude de RMB ont fait l'objet d'études plus approfondies.

La caractérisation des composés phénoliques d'extraits aqueux de RMB a permis de mettre en évidence pour la première fois dans cette espèce, la *cyandin-3-O-glucoside*, la *quercetin-3-O-galactoside*, la *quercetin-3-O-arabinoside* et la *quercétine*. Aussi, 13 composés phénoliques, déjà identifiés dans d'autres tissus d'érable rouge (feuille et écorce) ont été identifiés parmi les composés majoritaires de cet extrait. Rapportés comme constituants majoritaires des extraits de RMB, les gallotanins d'érables ou acertanins représentaient près de 25 % (m/m) de l'extrait sec. Aussi, la ginnaline A s'est avérée être le composé majoritaire de cet extrait aqueux à raison de plus de 10% (m/m) de l'extrait sec.

Les essais sur la toxicité d'extraits aqueux de RMB qui ont été réalisés en première approche et à titre exploratoire sur les neutrophiles ont révélé une absence de toxicité cellulaire (nécrose) et aucun effet sur les stades de la viabilité cellulaire jusqu'à 100 µg/mL. Néanmoins, face aux résultats prometteurs de ces produits naturels, des tests de toxicité aiguë et chronique devront être envisagés sur des modèles vivants afin de confirmer la sécurité d'emploi de ces produits naturels.

Pour des concentrations supérieures à 100 µg/mL, les extraits aqueux de RMB ont montré une capacité à augmenter la mort programmée des neutrophiles. Sachant que ces cellules majeures sont impliquées dans la réponse inflammatoire chronique et que l'induction de leur mort programmée pourrait atténuer leurs effets délétères, nous avons scruté l'extrait à la recherche des molécules responsables de cette activité. Les tests effectués sur des fractions et des molécules provenant de l'extrait à l'eau chaude de bourgeons d'érable rouge ont indiqué que les gallotanins étaient bien responsables de cette activité biologique. La ginnaline A, la ginnaline 3,6 et la ginnaline C ont affiché les meilleures capacités à induire l'apoptose des neutrophiles. Enfin nous avons mis en évidence pour la première fois que l'activité de l'extrait aqueux de RMB et de ses fractions était due aux effets additifs de ces molécules actives mais que, cependant, la ginnaline C, lorsqu'elle était présente à forte concentration, pouvait réduire l'activité du mélange.

En somme, ces résultats probants laissent apercevoir de nombreuses voies de valorisation pour les gallotanins de l'extrait aqueux de bourgeons de l'érable rouge, qu'ils soient dans des fractions enrichies ou sous forme de composés purs à condition de démontrer leur efficacité sur des modèles vivants.

PERSPECTIVE ET TRAVAUX EN COURS

Face aux éventuelles pistes de valorisation évoquées pour des extraits provenant de bourgeons d'érable de nombreuses perspectives d'études peuvent être proposées en vue de compléter cette étude.

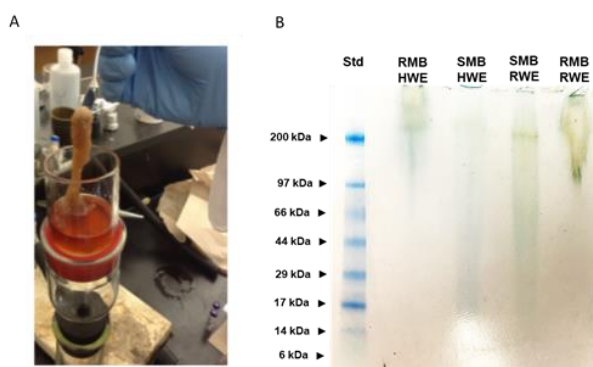
1. Définition de marqueur d'identification chimique et microscopique de la matière végétale

L'existence d'une énorme biodiversité dans la nature rend parfois difficile l'identification stricte des espèces par une simple observation macroscopique. Pourtant, cette étape souvent négligée est un aspect primordial pour la validité des résultats obtenus surtout lorsque que de nouveaux produits naturels sont décrits. Dans la plupart de la pharmacopée, la description minutieuse de la matière végétale tient compte de l'aspect macroscopique, microscopique et chimique. Dans le cas des bourgeons d'érable à sucre et d'érable rouge, la description macroscopique est bien documentée dans la littérature. Au niveau de la chimique, la ginnaline A pourrait être introduite comme marqueur d'identification chimique pour des extraits de bourgeons d'érable rouge (paramètre d'identification par CCM et HPLC à décrire). Des marqueurs chimiques d'identification chimique devront également être définis pour les bourgeons de l'érable à sucre. Enfin des analyses en microscopie optique des bourgeons (entiers et broyés) devront également être réalisées afin de définir des éléments de reconnaissance propres aux bourgeons de ces deux essences forestières.

2. Analyses chimiques du contenu à approfondir.

La valorisation des produits naturels issus d'extraits de bourgeons d'érable passe nécessairement par une connaissance complète de son contenu chimique. À date, environ 30% du contenu chimique de l'extrait aqueux de RMB est connu. Des études complémentaires devront donc être menées dans ce sens.

En rappel, les explorations chimiques ont révélé que des dérivés d'acides aminés et de glucides étaient également présents dans les extraits aqueux obtenus à partir des bourgeons des deux essences. Une précipitation différentielle des macromolécules (polysaccharides et protéines) solubles dans les extraits à l'eau chaude des bourgeons d'érable a été réalisée et les expérimentations sont en cours (**Figure 4.4-A**).



(A) Précipitation différentielle des macromolécules solubles à l'eau chaude; (B) Électrophorèse des extraits aqueux (HWE, Hot water extract) et fractions aqueuses restantes (RWF, Remaining Water Fraction)

Figure 4.4 : Exploration du contenu en protéines des extraits aqueux de bourgeons d'érable

Les premières explorations chimiques (détermination de l'azote total dans les fractions précipitées) ont indiqué une faible teneur en dérivés azotés. La séparation en électrophorèse (**Figure 4.4-B**) semble également indiquer que ces dérivés seraient plutôt des acides aminés et / ou peptides, donc de petites tailles. Des analyses de protéomique associant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse devrait permettre d'en savoir plus sur la nature de ces dérivés azotés. Aussi, la nature chimique des dérivés glucidiques des extraits issus des deux essences et celle des composés phénoliques de SMB devront également faire l'objet de prochains travaux.

3. Mécanisme d'action moléculaire et activité antiinflammatoire de la ginnaline A *in vivo*

Nous avons mis en évidence pour la première fois que la ginnaline A pouvait induire l'apoptose de neutrophiles. Cependant, les mécanismes moléculaires et voies de transduction par lesquels cette molécule parvient à cet effet biologique sont encore à découvrir. Aussi, l'influence de l'induction de l'apoptose des neutrophiles sur la réponse inflammatoire, par exemple sur la production de médiateurs de l'inflammation (cytokines, lipides bioactifs, molécules d'adhésion cellulaires) ou sur l'état inflammatoire de modèles vivants devrait conforter le potentiel de la ginnaline A.

4. Données de pharmacocinétique de la ginnaline A

La ginnaline A n'a fait l'objet d'aucune étude pharmacocinétique jusqu'à présent. Pourtant ces paramètres ADME (Absorption - Distribution - Métabolisme - Élimination) sont fondamentaux pour envisager de potentiels voies d'administration et envisager le devenir des molécules actives dans les organismes vivants. L'évaluation de ces paramètres devra également être considérée.

5. Preuves de sécurité d'utilisation

Les premières explorations de toxicité sur les neutrophiles humaines et les données d'utilisations ancestrales d'espèces végétales de composition chimique similaire laisse entrevoir une sécurité d'emploi pour les produits naturels issus de bourgeons d'érable rouge. Néanmoins, des expériences de toxicité aiguë et chronique sont à prévoir en fonction des résultats complémentaires de chimie, de pharmacocinétique et des domaines de valorisation retenus pour ces extraits et molécules bioactifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdi, K., Safarian, S., Esmaili, N. et Ebrahimzadeh, H. (2011). Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 74. doi:10.4103/0973-1296.75906
- Abou-Zaid, M. M., Helson, B. V., Nozzolillo, C. et Arnason, J. T. (2001). Ethyl m-digallate from red maple, *Acer rubrum* L., as the major resistance factor to forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* Hbn. *Journal of chemical ecology*, 27(12), 2517–2527.
- Abou-Zaid, M. M., Nozzolillo, C., Tonon, A., Coppens, M. et Lombardo, D. A. (2008). High-Performance Liquid Chromatography Characterization and Identification of Antioxidant Polyphenols in Maple Syrup*. *Pharmaceutical Biology*, 46(1-2), 117-125. doi:10.1080/13880200701735031
- Acevedo-Rodríguez, P., Welzen, P. C. V., Adema, F. et Ham, R. W. J. M. van der. (2010). Sapindaceae. Dans *Flowering Plants. Eudicots* (p. 357-407). Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-14397-7_17
- Adams, G. A. (1961). Constitution of a Glucomannan from the Sapwood of Sugar Maple (*Acer Saccharum*). *Canadian Journal of Chemistry*, 39(12), 2423-2430. doi:10.1139/v61-321
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. et Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- Ainsworth, E. A. et Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877. doi:10.1038/nprot.2007.102
- Akgul, C. et Edwards, S. W. (2003). Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(11), 2402-2408. doi:10.1007/s00018-003-3110-z
- Alam, M. N., Bristi, N. J. et Rafiqzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. et Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253-261. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.072
- Almutairi, M. S. et Ali, M. (2015). Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR. *Natural Product Research*, 29(13), 1271-1275. doi:10.1080/14786419.2014.992345
- Alward, A., Corriher, C. A., Barton, M. H., Sellon, D. C., Blikslager, A. T. et Jones, S. L. (2006). Red Maple (*Acer rubrum*) Leaf Toxicosis in Horses: A Retrospective Study of 32 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(5), 1197-1201. doi:10.1111/j.1939-1676.2006.tb00722.x
- Amorati, R., Foti, M. C. et Valgimigli, L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847. doi:10.1021/jf403496k
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. et Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459-489. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Anderson, J. V., Chao, W. S. et Horvath, D. P. (2001). Review: A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. *Weed Science*, 49(5), 581-589. doi:10.1614/0043-1745(2001)049[0581:RCROTR]2.0.CO;2
- Anderson, N. et Mitchell, D. (2016). Forest Operations and Woody Biomass Logistics to Improve Efficiency, Value, and Sustainability. *BioEnergy Research*, 9(2), 518-533. doi:10.1007/s12155-016-9735-1
- Anouar, E. H. (2011). *Theoretical investigations of the antioxidant, optical and electronic properties of polyphenols* (Thèse de doctorat). Université de Limoges. Faculté de médecine et de pharmacie, France.
- Anseau, C. et Bernier, H. (1995). Position taxonomique et biogéographique de l'érable à sucre. Dans *L'Érable à sucre: caractéristiques, écologie et aménagement* (p. 394). Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts [Ottawa] Gouvernement du Québec, Ministère des ressources naturelles : Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation [Québec] : Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M. et Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5). doi:10.1351/PAC-REP-12-07-15

- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. et Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027. doi:10.1021/acs.jafc.5b04739
- Apostolidis, E., Li, L., Kang, B., Lee, C. M. et Seeram, N. P. (2012). Seasonal influence on phenolic-mediated antihyperglycemic properties of Canadian sugar and red maple leaves using in vitro assay models. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 753-760. doi:10.1007/s10068-012-0098-x
- Arnason, T., Hebda, R. J. et Johns, T. (1981). Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany*, 59(11), 2189-2325. doi:10.1139/b81-287
- Arnow, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. biol. Chem.*, 118(2), 531-537.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- B**aker, R. W. (2012). Overview of Membrane Science and Technology. Dans *Membrane Technology and Applications* (p. 1-14). John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9781118359686.ch1
- Balasaheb Nimse, S. et Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. doi:10.1039/C4RA13315C
- Barr, J. et Nordin, P. (1980). Biosynthesis of glycoproteins by membranes of *Acer pseudoplatanus*. Incorporation of mannose and N-acetylglucosamine. *Biochemical Journal*, 192(2), 569-577. doi:10.1042/bj1920569
- Bate-Smith, E. C. (1977). Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry*, 16(9), 1421-1426.
- Bate-Smith, E. C. (1978). Systematic aspects of the astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry*, 17(11), 1945-1948.
- Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W. et Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(2), 419-444. doi:10.1016/S8755-9668(86)80021-7
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. et Stryer, L. (2002). Protein Turnover and Amino Acid Catabolism. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21182/>
- Berg, L. (2007). *Introductory Botany: Plants, People, and the Environment, Media Edition*. Cengage Learning.
- Bhagavan, N. V. (2002). Chapter 17 - Protein and Amino Acid Metabolism. Dans *Medical Biochemistry (Fourth Edition)* (p. 331-363). San Diego : Academic Press. doi:10.1016/B978-012095440-7/50019-6
- Bi, W., Gao, Y., Shen, J., He, C., Liu, H., Peng, Y., ... Xiao, P. (2016). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Acer* (maple): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 189, 31-60. doi:10.1016/j.jep.2016.04.021
- Bi, W., Shen, J., Gao, Y., He, C., Peng, Y. et Xiao, P. (2016). Ku-jin tea (*Acer tataricum* subsp. *ginnala* or *A. tataricum* subsp. *theiferum*), an underestimated functional beverage rich in antioxidant phenolics. *Journal of Functional Foods*, 24(Supplement C), 75-84. doi:10.1016/j.jff.2016.04.002
- Bijnsdorp, I., Giovannetti, E. et Peters, G. (2011). Analysis of Drug Interactions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 731, 421-34. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_34
- Björnsdóttir, H. (2015). *Intracellular radicals in neutrophils - processing and functional implications* (Doctor of Philosophy (Medicine), University of Gothenburg. Sahlgrenska Academy., Gothenburg, Sweden). Repéré à <https://gupea.ub.gu.se/handle/2077/38376>
- Bohlon, S. S., O'Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M.-M. et Fraser, D. A. (2014). Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00402
- Bouguerne, B. (2012). *Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)* (phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier). Repéré à <http://thesesups.ups-tlse.fr/1562/>
- Boyer, J. D., Breeden, D. C. et Brown, D. L. (2002). Isolation, identification, and characterization of compounds from *acer rubrum* capable of oxidizing equine erythrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 63(4), 604-610.
- Brasseur, T. et Angenot, L. (1986). Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400: Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography*, 351. Repéré à <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/41375>
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, D., ... Stevens, P. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Dans *Botanical Journal*

- of the Linnean Society (vol. 161:2, s. 105-121). Botanical Journal of the Linnean Society. Repéré à <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:su:diva-36155>
- Brereton, R. G. (2003). Pattern Recognition. Dans *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant* (p. 183-269). John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/0470863242.ch4
- Briellmann, H., Setzer, R. W., Kaufman, P., Kirakosyan, A., Cseke, L. et Warber, S. (2006). Phytochemicals: the chemical components of plants. Dans *Natural Products from Plants, Second Edition* (p. 1-49). London : CRC Press. Repéré à <https://www.scienceopen.com/document?vid=409f1cdb-49ba-4c55-a114-ed4363c3b6e5>
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G. et Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*. Repéré à <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300768826>
- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J. et Simirgiotis, M. J. (2014). Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts. *Molecules*, 19(8), 10936-10955. doi:10.3390/molecules190810936
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E. et Giaccone, G. (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3155-3162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2223
- Brukhin, V. et Morozova, N. (2011). Plant Growth and Development - Basic Knowledge and Current Views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(2), 1-53. doi:10.1051/mmnp/20116201
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. Paris; Cachan : Tec & Doc Lavoisier.
- Buerki, S., Forest, F., Acevedo-Rodríguez, P., Callmander, M. W., Nylander, J. A. A., Harrington, M., ... Alvarez, N. (2009). Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(2), 238-258. doi:10.1016/j.ympev.2009.01.012
- Buerki, S., Lowry II, P. P., Alvarez, N., Razafimandimbison, S. G., Küpfer, P. et Callmander, M. W. (2010). Phylogeny and circumscription of Sapindaceae revisited: molecular sequence data, morphology and biogeography support recognition of a new family, Xanthoceraceae. *Plant Ecology and Evolution*, 143(2), 148-159. doi:10.5091/plecevo.2010.437
- Burgot, P. J.-L. (2012). Applications of the Formation of Complexes in Inorganic Analysis. Dans *Ionic Equilibria in Analytical Chemistry* (p. 543-572). Springer New York. Repéré à http://link.springer.com/acces.bibl.ulaval.ca/chapter/10.1007/978-1-4419-8382-4_30
- Buszewski, B. et Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231-247. doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- Caielli, S., Banchereau, J. et Pascual, V. (2012). Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Current opinion in immunology*, 24(6), 671-677. doi:10.1016/j.coi.2012.09.008
- Cambero, C., Sowlati, T., Marinescu, M. et Röser, D. (2015). Strategic optimization of forest residues to bioenergy and biofuel supply chain. *International Journal of Energy Research*, 39(4), 439-452. doi:10.1002/er.3233
- Campos, P. M. B. G. M., Melo, M. O. et Junior, F. B. C. (2014). Effects of Polysaccharide-Based Formulations on Human Skin. Dans K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (dir.), *Polysaccharides* (p. 1-18). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-03751-6_64-1
- Carocho, M. et Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Carreras Cardona, A. (2012). Study of the Electron-Transfer properties of phenolics and their relationship with the biological activity on cancer cells. Repéré à <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/36214>
- Cell Death and Apoptosis. (s.d.). *School of Life Sciences*. Text. Repéré 9 décembre 2017, à [//www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/cell-death-and-apoptosis](http://www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/cell-death-and-apoptosis)
- Chakravarti, A., Rusu, D., Flamand, N., Borgeat, P. et Poubelle, P. E. (2009). Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Laboratory Investigation*, 89(10), 1084-1099. doi:10.1038/labinvest.2009.74
- Chang, L. C., Song, L. L., Park, E. J., Luyengi, L., Lee, K. J., Farnsworth, N. R., ... Kinghorn, A. D. (2000). Bioactive Constituents of *Thuja occidentalis*. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1235-1238. doi:10.1021/np0001575

- Charcosset, C. (2006). Membrane processes in biotechnology: An overview. *Biotechnology Advances*, 24(5), 482-492. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.002
- Charrier, G. (2011). *Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres: application au noyer Juglans regia L.* (Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II). Repéré à <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00662461/>
- Chen, C. Y., Taniguchi, M. et Lindsey, J. S. (2014). NMR spectral properties of 16 synthetic bacteriochlorins with site-specific ¹³ C or ¹⁵ N substitution. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 18(06), 433-456. doi:10.1142/S1088424614500199
- Chen, Z. E., Wufuer, R., Ji, J. H., Li, J. F., Cheng, Y. F., Dong, C. X. et Taoerdahong, H. (2017). Structural Characterization and Immunostimulatory Activity of Polysaccharides from Brassica rapa L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.7b03902
- Chou, T.-C. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer research*, 70, 440-6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
- Chow, P. S. et Landhäusser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*, 24(10), 1129-1136.
- Cieśla, Ł. et Kowalska, I. (2013). Detection and Identification in TLC Drug Analysis. Dans *Thin Layer Chromatography in Drug Analysis* (vol. 1-0, p. 193-224). CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15637-14>
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q
- Codignola, A., Maffei, M. et Fieschi, M. (1988). Qualitative variations in endogenous phenols in dormant buds of *Fagus sylvatica* L. *New Phytologist*, 110(4), 473-477. doi:10.1111/j.1469-8137.1988.tb00285.x
- Colon, M. et Nerín, C. (2016). Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. *European Food Research and Technology*, 242(2), 211-220. doi:10.1007/s00217-015-2532-9
- Cooper, R. et Nicola, G. (2014). *Natural Products Chemistry*. CRC Press. doi:10.1201/b17244
- Coqueiro, A., Regasini, L. O., Skrzek, S. C. G., Queiroz, M. M. F., Silva, D. H. S. et da Silva Bolzani, V. (2013). Free Radical Scavenging Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). *Molecules*, 18(2), 2376-2385. doi:10.3390/molecules18022376
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R. et Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x
- Cragg, G. M. et Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3670-3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
- Crozier, A., Clifford, M. N. et Ashihara, H. (dir.). (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford ; Ames, Iowa : Blackwell Pub.
- Cui, S. W. (2005). *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. CRC Press.
- Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. Dans D. Martin (dir.), *Column Chromatography*. InTech. Repéré à <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds>
- D**avid, B., Wolfender, J.-L. et Dias, D. A. (2015). The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, 14(2), 299-315. doi:10.1007/s11101-014-9367-z
- Debenedetti, S. L. (2009). TLC and PC. Dans *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/ Natural Products* (p. 103-134). Science Publishers. doi:10.1201/b10195-8
- Destandau, E., Michel, T. et Elfakir, C. (2013). Microwave-assisted Extraction. Dans *CHAPTER 4: Microwave-assisted Extraction*. Repéré à <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849736060-00113/978-1-84973-606-0>
- Dettmer-Wilde, K. et Engewald, W. (2014). *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. Springer.
- Dewick, P. M. (2001). Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. Dans *Medicinal Natural Products* (p. 7-34). John Wiley & Sons, Ltd. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470846275.ch2/summary>

- Dewitt, S. F., Bedenice, D. et Mazan, M. R. (2004). Hemolysis and Heinz body formation associated with ingestion of red maple leaves in two alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(4), 578-583, 539.
- Dicko, M., Darkrim Lamari, F., Lepesant, G., Silar, P., Bilodeau, C. et Cohen, M. (2016). Biomolécules from olive pruning waste in Sierra Mágina. Dans *CYPRUS 2016 4th International Conference on Sustainable Solid Waste Management*. Limassol, Greece. Repéré à <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01350824>
- Digital representation of tree species range maps from « Atlas of United States trees » by Elbert L. Little, Jr. (and other publications). (2017). Repéré 8 décembre 2017, à <https://archive.usgs.gov/archive/sites/www.usgs.gov/www.usgs.gov/science/cite-view82db.html>
- Diouf, P. N., Stevanovic, T. et Boutin, Y. (2009). The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 297-303. doi:10.1016/j.indcrop.2009.05.008
- Dirr, M. A. (2009). *Manual of Woody Landscape Plants: Their Identification, Ornamental Characteristics, Culture, Propagation and Uses* (6 Revised edition). Champaign, Ill : Stipes Pub Llc.
- Donno, D., Beccaro, G. L., Cerutti, A. K., Mellano, M. G. et Bounous, G. (2015). Bud Extracts as New Phytochemical Source for Herbal Preparations — Quality Control and Standardization by Analytical Fingerprint. Dans A. V. Rao et L. G. Rao (dir.), *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech. Repéré à <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/bud-extracts-as-new-phytochemical-source-for-herbal-preparations-quality-control-and-standardization>
- Dorward, D. A., Rossi, A. G., Dransfield, I. et Lucas, C. D. (2014). Assessment of Neutrophil Apoptosis. Dans *Neutrophil Methods and Protocols* (p. 159-180). Humana Press, Totowa, NJ. doi:10.1007/978-1-62703-845-4_10
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11. doi:10.1038/nrc1252
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.-M. et Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4527-4536. doi:10.1021/jf104791t
- DuPage, M. et Bluestone, J. A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), 149-163. doi:10.1038/nri.2015.18
- E**fferth, T. et Koch, E. (2011). Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Current Drug Targets*, 12(1), 122-132.
- El Kebir, D. et Filep, J. G. (2010). Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1731-1748. doi:10.1100/tsw.2010.169
- El Kebir, D. et Filep, J. G. (2013). Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through $\beta 2$ Integrins. *Frontiers in Immunology*, 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00060
- Elena, D. L. (2012). Pharmacognostic Methods for Analysis of Herbal Drugs, According to European Pharmacopoeia. *Edited by Purusotam Basnet*, 37.
- Elipse, S. et Victoria, M. (2011). Basic Technical Aspects and Operation of LC-NMR and LC-MS-NMR. Dans *LC-NMR and Other Hyphenated NMR Techniques* (p. 59-94). John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118135396.ch3
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Erdélyi, K., Kiss, A., Bakondi, E., Bai, P., Szabó, C., Gergely, P., ... Virag, L. (2005). Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Molecular Pharmacology*, 68(3), 895-904. doi:10.1124/mol.105.012518
- Eyles, J. L., Roberts, A. W., Metcalf, D. et Wicks, I. P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(9), 500-510. doi:10.1038/ncprheum0291
- F**édération des producteurs acéricoles du Québec. (2017). Statistiques Fédération des producteurs acéricoles du Québec. *Fédération des producteurs acéricoles du Québec*. Repéré à <http://fpaq.ca/la-federation/production/statistiques/>

- Fiorucci, S. (2006). *Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire* (Thèse de doctorat). Université de Nice-Sophia Antipolis. Faculté des sciences, France.
- Firn, R. (2009). What Are Natural Products? Dans *Nature's Chemicals* (p. 1-12). Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780199566839.003.0001
- Firn, R. et Jones, C. G. (2009). A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 719-726. doi:10.1093/jxb/erp002
- Forest, V., Figarol, A., Boudard, D., Cottier, M., Grosseau, P. et Pourchez, J. (2015). Adsorption of Lactate Dehydrogenase Enzyme on Carbon Nanotubes: How to Get Accurate Results for the Cytotoxicity of These Nanomaterials. *Langmuir*, 31(12), 3635-3643. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00631
- Forgács, E. et Cserhádi, T. (2003). CHROMATOGRAPHY | Principles. Dans B. Caballero (dir.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (p. 1259-1267). Oxford : Academic Press. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00230-3
- Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1673-1685. doi:10.1211/jpp.59.12.0010
- Fowden, L. et Pratt, H. M. (1973). Cyclopropylamino acids of the genus Acer: Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*, 12(7), 1677-1681. doi:10.1016/0031-9422(73)80387-5
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C. et Rossi, A. G. (2010). Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 216-227. doi:10.1159/000284367
- Franz, S., Muñoz, L. E., Heyder, P., Herrmann, M. et Schiller, M. (2015). Unconventional apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (PMN): staurosporine delays exposure of phosphatidylserine and prevents phagocytosis by MΦ-2 macrophages of PMN. *Clinical and Experimental Immunology*, 179(1), 75-84. doi:10.1111/cei.12412
- Fritzinger, D. C. et Benjamin, D. E. (2016). The Complement System in Neuropathic and Postoperative Pain. *The Open Pain Journal*, 9(1). doi:10.2174/1876386301609010026
- Futosi, K., Fodor, S. et Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17(3), 638-650. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034
- García-Pérez, M.-E., Allaey, I., Rusu, D., Pouliot, R., Stevanovic, T. et Poubelle, P. E. (2014). Picea mariana polyphenolic extract inhibits proinflammatory mediators produced by TNF- α -activated psoriatic keratinocytes: Impact on NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 265-278. doi:10.1016/j.jep.2013.10.034
- Geering, B. et Simon, H.-U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death and Differentiation*, 18(9), 1457-1469. doi:10.1038/cdd.2011.75
- Gemperline, P. (2006). *Practical Guide To Chemometrics, Second Edition*. Boca Raton, Florida : CRC Press.
- Genetet, N. (2002). *Immunologie*. Londres; Paris; New York (N.Y.); Cachan : Tec & Doc ; Éd. médicales internationales.
- Geoffroy, T. R., Meda, N. R. et Stevanovic, T. (2017). Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloyl derivatives from red maple bark extract. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi:10.1007/s00216-017-0465-9
- Ghisalberti, E. L. (2007). Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. Dans *Bioactive Natural Products* (vol. 1-0, p. 11-76). CRC Press. doi:10.1201/9781420006889.ch2
- Gibbons, S. (2012). An Introduction to Planar Chromatography and Its Application to Natural Products Isolation. Dans *Natural Products Isolation* (p. 117-153). Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_6
- Glen'ski, M., Włodarczyk, M., Bassarello, C., Pizza, C., Stefanowicz, P. et Świtalska, M. (2009). A major saponin from leaves extract of Acer velutinum. *Zeitschrift Für Naturforschung. B, Chemical Sciences*, 64(9), 1081-1086.
- González-Sarriás, A., Li, L. et Seeram, N. P. (2012). Effects of Maple (Acer) Plant Part Extracts on Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Human Tumorigenic and Non-tumorigenic Colon Cells. *Phytotherapy Research*, 26(7), 995-1002. doi:10.1002/ptr.3677
- González-Sarriás, A., Ma, H., Edmonds, M. E. et Seeram, N. P. (2013). Maple polyphenols, ginnalins A–C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chemistry*, 136(2), 636-642. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.023

- González-Sarrías, A., Yuan, T. et Seeram, N. P. (2012). Cytotoxicity and structure activity relationship studies of maplexins A-I, gallotannins from red maple (*Acer rubrum*). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1369-1376. doi:10.1016/j.fct.2012.02.031
- Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., ... Kietzmann, T. (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biology*, 6, 372-385. doi:10.1016/j.redox.2015.08.016
- Gouvernement du Canada, R. naturelles C. (2016). *Produits forestiers canadiens - un choix légal et durable*. Repéré à <http://scf.rncan.gc.ca/publications?id=36713>
- Gouvernement du Canada, S. C. (2012, 18 mai). Cheminement des demandes de licence de mise en marché des produits de santé naturels utilisés comme remèdes traditionnels. document de consultation. Repéré 10 novembre 2015, à <http://hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/legislation/docs/tradit-fra.php>
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391. doi:10.1007/s00204-011-0774-2
- H**ajslova, J., Mastovska, K. et Cajka, T. (2008). Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. Dans *Handbook of Food Analysis Instruments* (vol. 1-0). CRC Press. doi:10.1201/9781420045673.ch10
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C. et Chapelle, J. P. (2007). [Oxidative stress]. *Revue Médicale De Liège*, 62(10), 628-638.
- Haq, S. et Adams, G. A. (1961). Oligosaccharides from the Sap of Sugar Maple (*acer Saccharum* Marsh). *Canadian Journal of Chemistry*, 39(6), 1165-1170. doi:10.1139/v61-147
- Harizi, H., Corcuff, J.-B. et Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, 14(10), 461-469. doi:10.1016/j.molmed.2008.08.005
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19), 894-901. doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004
- Hawco, C. L. A., Wang, Y., Taylor, M. et Weaver, D. F. (2016). A Maple Syrup Extract Prevents β -Amyloid Aggregation. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 43(1), 198-201. doi:10.1017/cjn.2015.270
- Hewapathirane, D. S. et Haas, K. (2008). Single Cell Electroporation in vivo within the Intact Developing Brain. *Journal of Visualized Experiments*, (17). doi:10.3791/705
- Hiai, S., Oura, H. et Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(2), 116-122. doi:10.1055/s-0028-1097639
- Honma, A., Koyama, T. et Yazawa, K. (2010). Anti-hyperglycemic effects of sugar maple *Acer saccharum* and its constituent acertannin. *Food Chemistry*, 123(2), 390-394. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.052
- Horvath, D. P. (2010). Bud Dormancy and Growth. Dans *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives: Volume 1* (vol. 1). Verlag Berlin Heidelberg : Springer.
- Horvath, D. P., Anderson, J. V., Chao, W. S. et Foley, M. E. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science*, 8(11), 534-540. doi:10.1016/j.tplants.2003.09.013
- Hostettmann, K. et Marston, A. (2005). *Saponins*. Cambridge University Press.
- Hu, C. et Liu, Y. (2011). Quality Control in Pharmaceuticals: Residual Solvents Testing and Analysis. doi:10.5772/23041
- Huang, D., Ou, B. et Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
- I**ba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y. et Murai, M. (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of Intensive Care*, 1(1). doi:10.1186/2052-0492-1-13
- Ieri, F., Innocenti, M., Possieri, L., Gallori, S. et Mulinacci, N. (2015). Phenolic composition of "bud extracts" of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, 1-9. doi:10.1016/j.jpba.2015.06.004
- Ito, Y. (2014). Counter-Current Motion in Counter-Current Chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1372, 128-132. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.033

- J**ančinová, V., Perečko, T., Harmatha, J., Nosál, R. et Drábiková, K. (2012). Decreased activity and accelerated apoptosis of neutrophils in the presence of natural polyphenols. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 59. doi:10.2478/v10102-012-0010-9
- Jančinová, V., Perečko, T., Nosál, R., Mihalová, D., Bauerová, K. et Drábiková, K. (2011). Pharmacological regulation of neutrophil activity and apoptosis. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(1), 11-14. doi:10.2478/v10102-011-0003-0
- Ji, B. C., Hsu, W. H., Yang, J. S., Hsia, T. C., Lu, C. C., Chiang, J.-H., ... Chung, J.-G. (2009). Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7596-7604. doi:10.1021/jf901308p
- Ji, S. B., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A. et Honda, T. (1992b). Galloylcyanidin glycosides from acer. *Phytochemistry*, 31(2), 655-657. doi:10.1016/0031-9422(92)90054-T
- Ji, S. B., Yokoi, M., Saito, N. et Mao, L. S. (1992a). Distribution of anthocyanins in aceraceae leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20(8), 771-781. doi:10.1016/0305-1978(92)90036-D
- Jin, Z. et El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 147-171. doi:10.4161/cbt.4.2.1508
- Jones, R. L. et Wofford, B. E. (2014). *Woody Plants of Kentucky and Tennessee: The Complete Winter Guide to Their Identification and Use*. University Press of Kentucky.
- Jones, W. P. et Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of plant secondary metabolites. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 864, 341-366. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_13
- Joullié, M. M., Thompson, T. R. et Nemeroff, N. H. (1991). Ninhydrin and ninhydrin analogs. Syntheses and applications. *Tetrahedron*, 47(42), 8791-8830. doi:10.1016/S0040-4020(01)80997-2
- Jourdes, M., Pouységu, L., Deffieux, D., Teissedre, P. L. et Quideau, S. (2013). Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. Dans K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (dir.), *Natural Products* (p. 1975-2010). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-22144-6_65
- K**amal-Eldin, A. et Budilarto, E. (2015). Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. Dans F. Shahidi (dir.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 141-159). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00006-3
- Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Kondo, T., Ishijima, T., ... Abe, K. (2015). Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(11), 1893-1897. doi:10.1080/09168451.2015.1042833
- Kanlayavattanukul, M. et Lourith, N. (2015). Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics. Dans K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (dir.), *Polysaccharides* (p. 1867-1892). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16298-0_29
- Karas, D., Ulrichová, J. et Valentová, K. (2017). Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food and Chemical Toxicology*, 105(Supplement C), 223-240. doi:10.1016/j.fct.2017.04.021
- Kareru, P. G., Keriko, J. M., Gachanja, A. N. et Kenji, G. M. (2007). Direct Detection of Triterpenoid Saponins in Medicinal Plants. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 5(1), 56-60.
- Kasangana, P. B., Haddad, P. S. et Stevanovic, T. (2015). Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Myrianthus Arboreus (Cecropiaceae) Root Bark Extracts. *Antioxidants*, 4(2), 410-426. doi:10.3390/antiox4020410
- Kaushal, N. (2012). Inflammation, oxidative stress and antioxidants. Dans *Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional & Therapeutic interventions* (CRC Press (Taylor and Francis Group), p. 259-271). Sashwati Roy, Debasis Bagchi, Siba P Paruchaudhari.
- Kim, H. J., Woo, E.-R., Shin, C.-G. et Park, H. (1998). A New Flavonol Glycoside Gallate Ester from Acer okamotoanum and Its Inhibitory Activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase. *Journal of Natural Products*, 61(1), 145-148. doi:10.1021/np970171q
- King, K. Y. et Goodell, M. A. (2011). Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature Reviews Immunology*, 11(10), 685. doi:10.1038/nri3062
- Kiss, A. K. et Piwowarski, J. (2016). Ellagitannins, gallotannins and their metabolites- the contribution to the anti-inflammatory effect of food products and medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*.

- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Whitney, A. R. et DeLeo, F. R. (2005). Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(6), 1408-1418. doi:10.1189/jlb.0605289
- Kolaczowska, E. et Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159-175. doi:10.1038/nri3399
- Komsta, L. (2012). Chemometrics in Fingerprinting by Means of Thin Layer Chromatography. *Chromatography Research International*, 2012, 1-5. doi:10.1155/2012/893246
- Kroemer, G. et Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nature Medicine*, 11(7), 725-730. doi:10.1038/nm1263
- Krohn, R. I. (2001). The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. Dans *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471143030.cba03hs15
- Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G. S. et Rawal, R. K. (2014). Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta*, 123, 186-199. doi:10.1016/j.talanta.2014.02.003
- Kumar, V., Abbas, A. K. et Aster, J. C. (2013). *Robbins Basic Pathology*. Elsevier Health Sciences.
- Kupchan, S. M. et Takasugi, M. (1970). Acerotin and acerocin, novel triterpene ester aglycones from the tumour-inhibitory saponins of *Acer negundo*. *Journal of The Chemical Society D: Chemical Communications*, (16). doi:10.1039/c29700000969
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 740, 13-19. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_3
- L**aitinen, M.-L., Julkunen-Tiitto, R. et Rousi, M. (2002). Foliar phenolic composition of European white birch during bud unfolding and leaf development. *Physiologia Plantarum*, 114(3), 450-460.
- Le, U. et Pathak, Y. (2011). Nutraceuticals: Advancing in a Right Direction. Dans *Handbook of Nutraceuticals* (CRC Press, vol. 2, p. 1-14).
- Lee, J., Durst, R. W. et Wrolstad, R. E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Lemli, J. a. J. M. (1976). Chemical Assay of Anthraquinone Drugs. *Pharmacology*, 14(Suppl. 1), 62-72. doi:10.1159/000136686
- Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P. et Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112(2), 454-460. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.111
- Li, J., Yue, J. et Shoup, S. (2006). Phylogenetics of acer (aceroideae, sapindaceae) based on nucleotide sequences of two chloroplast non-coding regions. *Harvard Papers in Botany*, 11(1), 101-115. doi:10.3100/1043-4534(2006)11[101:POAASB]2.0.CO;2
- Li, L., Henry, G. E. et Seeram, N. P. (2009). Identification and Bioactivities of Resveratrol Oligomers and Flavonoids from *Carex folliculata* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7282-7287. doi:10.1021/jf901716j
- Li, L. et Seeram, N. P. (2010). Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11673-11679. doi:10.1021/jf1033398
- Li, L. et Seeram, N. P. (2011a). Further Investigation into Maple Syrup Yields 3 New Lignans, a New Phenylpropanoid, and 26 Other Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7708-7716. doi:10.1021/jf2011613
- Li, L. et Seeram, N. P. (2011b). Quebecol, a novel phenolic compound isolated from Canadian maple syrup. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 125-128. doi:10.1016/j.jff.2011.02.004
- Li, L. et Seeram, N. P. (2012). Chemical Composition and Biological Effects of Maple Syrup. Dans *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease* (vol. 1-0, vol. 1093, p. 323-333). American Chemical Society. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2012-1093.ch018>
- Liang, N. et Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 19180-19208. doi:10.3390/molecules191119180

- Litwinienko, G. et Ingold, K. U. (2003). Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. 1. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(9), 3433-3438. doi:10.1021/jo026917t
- Litwinienko, G. et Ingold, K. U. (2005). Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 3. Novel Kinetics in Sequential Proton Loss Electron Transfer Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 70(22), 8982-8990. doi:10.1021/jo051474p
- Liu, J., Willför, S. et Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001
- Lloyd, P. J. et Wyk, J. V. (2011). Introduction to Extraction in Food Processing. Dans *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* (vol. 1-0, p. 1-24). CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11241-2>
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 147-152. doi:10.1016/S0165-0270(99)00193-4
- López, M. L., Dambolena, J. S., Zunino, M. P. et Zygadlo, J. A. (2009). GC and GC-MS of Terpenoids. Dans *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/ Natural Products* (vol. 1-0, p. 203-235). Science Publishers. doi:10.1201/b10195-11
- López-Alarcón, C. et Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10. doi:10.1016/j.aca.2012.11.051
- Louis, K. S. et Siegel, A. C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 740, 7-12. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Lu, R.-L., Hu, F.-L. et Xia, T. (2010). Activity-Guided Isolation and Identification of Radical Scavenging Components in Gao-Cha Tea. *Journal of Food Science*, 75(8), H239-H243. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01804.x
- Lucas, C. D., Allen, K. C., Dorward, D. A., Hoodless, L. J., Melrose, L. A., Marwick, J. A., ... Rossi, A. G. (2013). Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway. *The FASEB Journal*, 27(3), 1084-1094. doi:10.1096/fj.12-218990
- Luo, H. R. et Loison, F. (2008). Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *American Journal of Hematology*, 83(4), 288-295. doi:10.1002/ajh.21078
- Ma**, H., DaSilva, N. A., Liu, W., Nahar, P. P., Wei, Z., Liu, Y., ... Seeram, N. P. (2016). Effects of a Standardized Phenolic-Enriched Maple Syrup Extract on β -Amyloid Aggregation, Neuroinflammation in Microglial and Neuronal Cells, and β -Amyloid Induced Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Neurochemical Research*, 41(11), 2836-2847. doi:10.1007/s11064-016-1998-6
- Ma, H., Liu, W., Dain, J. A. et Seeram, N. P. (2017). Biological Evaluation of a Novel Red Maple Leaf Extract for Nutraceutical Applications. *The FASEB Journal*, 31(1 Supplement), lb413-lb413.
- Ma, H., Liu, W., Frost, L., Kirschenbaum, L. J., Dain, J. A. et Seeram, N. P. (2016). Glucitol-core containing gallotannins inhibit the formation of advanced glycation end-products mediated by their antioxidant potential. *Food & Function*, 7(5), 2213-2222. doi:10.1039/C6FO00169F
- Ma, H., Wang, L., Niesen, D. B., Cai, A., Cho, B. P., Tan, W., ... Seeram, N. P. (2015). Structure Activity Related, Mechanistic, and Modeling Studies of Gallotannins containing a Glucitol-Core and α -Glucosidase. *RSC advances*, 5(130), 107904-107915. doi:10.1039/C5RA19014B
- Ma, H., Xu, J., DaSilva, N. A., Wang, L., Wei, Z., Guo, L., ... Seeram, N. P. (2017). Cosmetic applications of glucitol-core containing gallotannins from a proprietary phenolic-enriched red maple (*Acer rubrum*) leaves extract: inhibition of melanogenesis via down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expression in B16F10 melanoma cells. *Archives of Dermatological Research*, 309(4), 265-274. doi:10.1007/s00403-017-1728-1
- Ma, X. M., Liu, Y. et Shi, Y.-P. (2007). Phenolic Derivatives with Free-Radical-Scavenging Activities from *Ixeridium gracile* (DC.) Shih. *Chemistry & Biodiversity*, 4(9), 2172-2181. doi:10.1002/cbdv.200790174
- Mahfoudhi, A., Grosso, C., Gonçalves, R. F., Khelifi, E., Hammami, S., Achour, S., ... Mighri, Z. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-cholinesterase, and antidiabetic potential of dry leaves and stems in *Tamarix aphylla* growing wild in Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*. doi:10.1002/cbdv.201600157

- Makahleh, A., Saad, B. et Bari, M. F. (2015). Synthetic phenolics as antioxidants for food preservative. Dans F. Shahidi (dir.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 51-78). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00003-8
- Malesev, D. et Kuntic, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10), 921-939. doi:10.2298/JSC0710921M
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. et Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 11(8), 519-531. doi:10.1038/nri3024
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A. et Alam, A. (2014). Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125-1140. doi:10.1111/1541-4337.12106
- Marie-Victorin, Brouillet, L., Rouleau, E., Goulet, I. et Hay, S. (2002). *Flore laurentienne*. Gaëtan Morin éditeur ltée.
- Mark, L. (2013). Go Prune the Grass? Repéré 9 décembre 2017, à <http://bivx-value-over-their.blogspot.ca/2013/08/go-prune-grass.html?m=0>
- Markowski, W. et Waksmundzka-Hajnos, M. (2010). Photodiode Array (PDA) and Other Detection Methods in HPLC of Plant Metabolites. Dans *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis* (vol. 1-0, p. 331-350). CRC Press. doi:10.1201/b10320-15
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.068
- Marzban, H., Del Bigio, M., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R. et Rastegar, M. (2015). Cellular Commitment in the Developing Cerebellum. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1-26. doi:10.3389/fncel.2014.00450
- Mateus, N. et Freitas, V. (2008). Anthocyanins as Food Colorants. Dans C. Winefield, K. Davies et K. Gould (dir.), *Anthocyanins* (p. 284-304). Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-77335-3_9
- Matsukawa, A. et Yoshinaga, M. (1999). Neutrophils as a source of cytokines in inflammation. *Histology and Histopathology*, 14(2), 511-516.
- McCracken, J. M. et Allen, L.-A. H. (2014). Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *Journal of Cell Death*, 7, 15-23. doi:10.4137/JCD.S11038
- Meda, N. R., Fraise, D., Gnoula, C., Vivier, M., Felgines, C. et Senejoux, F. (2017). Characterization of antioxidants from *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. leaves using HPLC-DAD coupled with pre-column DPPH assay. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1659-1666. doi:10.1007/s00217-017-2873-7
- Meda, N. R., Poubelle, P. E. et Stevanovic, T. (2017). Antioxidant capacity, phenolic constituents and toxicity of hot water extract from red maple buds. *Chemistry & Biodiversity*, n/a-n/a. doi:10.1002/cbdv.201700028
- Meriane, D., Genta-Jouve, G., Kaabeche, M., Michel, S. et Boutefnouchet, S. (2014). Rapid Identification of Antioxidant Compounds of *Genista saharae* Coss. *Molecules*, 19(4), 4369-4379. doi:10.3390/molecules19044369
- Mertens-Talcott, S. U. et Percival, S. S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 218(2), 141-151. doi:10.1016/j.canlet.2004.06.007
- Mian, A. J. et Timell, T. E. (1960). Isolation and Properties of a Glucmannan from the Wood of Red Maple (*Acer Rubrum* L.). *Canadian Journal of Chemistry*, 38(9), 1511-1517. doi:10.1139/v60-211
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312. doi:10.1002/ffj.1961
- Miguel-Chávez, R. S. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. doi:10.5772/66897
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipický, T. et Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(6), 963-975. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipický, T. et Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(6), 963-975. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010
- Molyneux, R. et Colegate, S. M. (2007). An Introduction and Overview. Dans *Bioactive Natural Products* (vol. 1-0, p. 1-9). CRC Press. doi:10.1201/9781420006889.ch1

- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17-22. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.127
- Mshvildadze, V., Legault, J., Lavoie, S., Gauthier, C. et Pichette, A. (2007). Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry*, 68(20), 2531-2536. doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.018
- Muhsinah, A. B., Ma, H., DaSilva, N. A., Yuan, T. et Seeram, N. P. (2017). Bioactive glucitol-core containing gallotannins and other phytochemicals from silver maple (*Acer saccharinum*) leaves. Dans *Natural Product Communications* (vol. 12, p. 83-84).
- N**agai, N., Ito, Y. et Taga, A. (2013). Comparison of the Enhancement of Plasma Glucose Levels in Type 2 Diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats by Oral Administration of Sucrose or Maple Syrup. *Journal of Oleo Science*, 62(9), 737-743. doi:10.5650/jos.62.737
- Nahar, P. P., Driscoll, M. V., Li, L., Slitt, A. L. et Seeram, N. P. (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Functional Foods*, 6, 126-136. doi:10.1016/j.jff.2013.09.026
- Naman, C. B., Leber, C. A. et Gerwick, W. H. (2017). Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. Dans I. Kurtböke (dir.), *Microbial Resources* (p. 103-120). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-804765-1.00005-9
- Narasimhulu, C. A., Jiang, X., Yang, Z., Selvarajan, K. et Parthasarathy, S. (2012). Is There a Connection between Inflammation and Oxidative Stress? Dans *Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions* (p. 139-152). Sashwati R., Debasis B., Siba P. R.
- Nathan, C. et Cunningham-Bussell, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 349-361. doi:10.1038/nri3423
- Ndhlala, A. R., Moyo, M. et Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, 15(10), 6905-6930. doi:10.3390/molecules15106905
- Nguyen, D.-M.-C., Seo, D.-J., Lee, H.-B., Kim, I.-S., Kim, K.-Y., Park, R.-D. et Jung, W.-J. (2013). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial Pathogenesis*, 56, 8-15. doi:10.1016/j.micpath.2013.01.001
- Nkhili, E. (2009). *Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant* (Thèse de doctorat). Université Cadi Ayyad (Marrakech, Maroc). Faculté des sciences Semlalia, France, Maroc.
- O**gawa, A., Miyamae, Y., Honma, A., Koyama, T., Yazawa, K. et Shigemori, H. (2011). Pycnalin, a new α -glucosidase inhibitor from *Acer pycnanthum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 59(5), 672-675.
- Okuda, T. et Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217. doi:10.3390/molecules16032191
- Oniszczuk, A. et Hawry, A. (2010). Sample Preparation of Plant Material. Dans *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis* (vol. 1-0, p. 107-149). Monika Waksmundzka-Hajnos and Joseph Sherma CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b10320-8>
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S. et Company, F. (2014). *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision* (7e édition). Paris : Dunod.
- Özek, T. et Demirci, F. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative Gas Chromatography. Dans *Natural Products Isolation* (p. 275-300). Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_11
- Özyürek, M., Güçlü, K. et Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664. doi:10.1016/j.trac.2010.11.016
- P**allardy, S. G. (2010). *Physiology of Woody Plants*. Academic Press.
- Palma, M., Barbero, G. F., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., ... Meireles, M. a. A. (2013). Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. Dans *CHAPTER 2:Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects*. Repéré à <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849736060-00058/978-1-84973-606-0>

- Paroni, G. et Brancolini, C. (2011). Measurement of Caspase Activity: From Cell Populations to Individual Cells. Dans *Mammalian Cell Viability* (p. 65-79). Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_9
- Pedersen, O. (2006). *Pharmaceutical Chemical Analysis: Methods for Identification and Limit Tests*. CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780203492260>
- Pedro, F. P. et Gonalo, C. J. (2012). Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. Dans V. Rao (dir.), *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech. doi:10.5772/29152
- Peng, B., He, C., Liu, H., Shen, J., Cao, L., Zhang, L. -h., ... Bi, W. (2017). Chemopreventive effects of Ku-jin tea against AOM-induced precancerous colorectal lesions in rats and metabolomic analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 1. doi:10.1038/s41598-017-16237-0
- Pérez, J. A. M., Fregoso, Aguilar et FregosoAguilar, T. A. (2013). Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. doi:10.5772/52247
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. et Vianello, A. (2013). Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14950-14973. doi:10.3390/ijms140714950
- Pichette, A., Eftekhari, A., Georges, P., Lavoie, S., Mshvildadze, V. et Legault, J. (2010). Cytotoxic phenolic compounds in leaf buds of *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Chemistry*, 88(2), 104-110. doi:10.1139/V09-151
- Pichette, A., Larouche, P., Lebrun, M. et Legault, J. (2006). Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, 20(5), 371-373. doi:10.1002/ptr.1863
- Pietra, F. (2002). Taxonomy, phylogeny, and natural products. Dans F. Pietra (dir.), *Tetrahedron Organic Chemistry Series* (vol. 1-Supplement C, vol. 21, p. 9-10). Elsevier. doi:10.1016/S1460-1567(02)80012-5
- Pinchuk, I., Shoal, H., Dotan, Y. et Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6), 638-647. doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003
- Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1-11. doi:10.1016/j.lwt.2005.07.023
- Popovici, C., Saykova, I. et Tylkowski, B. (2010, 23 août). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. <http://www.revue-genie-industriel.info>. text. Repéré 21 mai 2013, à <http://www.revue-genie-industriel.info/document.php?id=951>
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. et Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(1), 238-259. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.10.010
- Pradelli, L. A., Bénétou, M. et Ricci, J.-E. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), 1589-1597. doi:10.1007/s00018-010-0285-y
- Prior, R. L., Wu, X. et Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. doi:10.1021/jf0502698
- Procházková, D., Boušová, I. et Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Q**ueiroz, E. F., Hostettmann, K. et Wolfender, J.-L. (2012). Modern Approaches in the Search for New Active Compounds from Crude Extracts of Natural Sources. Dans V. Cechinel-Filho (dir.), *Plant Bioactives and Drug Discovery* (p. 43-80). John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118260005.ch2
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. et Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621. doi:10.1002/anie.201000044
- R**adhakrishna Pillai, G., Srivastava, A. S., Hassanein, T. I., Chauhan, D. P. et Carrier, E. (2004). Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Letters*, 208(2), 163-170. doi:10.1016/j.canlet.2004.01.008
- Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. m., Choi, J.-H., Shin, H.-C., Shin, S. C. et Shim, J.-H. (2015). Basic Overview on Gas Chromatography Columns. Dans *Analytical Separation Science*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/9783527678129.assep024

- Raven, P. H., Evert, R. F. et Eichhorn, S. E. (2000). *Biologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Reddy, P. R. et Raju, N. (2012). Gel-Electrophoresis and Its Applications. doi:10.5772/38479
- Redrejo-Rodriguez, M., Tejada-Cano, A., del Carmen Pinto, M. et Macías, P. (2004). Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure–activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 674(1), 121-124. doi:10.1016/j.theochem.2003.12.021
- Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D. et Lu, L. J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 11(6), 1492-1513. doi:10.1007/s11306-015-0823-6
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. et Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
- Rhee, K. C. (2001). Determination of Total Nitrogen. Dans *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/acces.bibl.ulaval.ca/doi/10.1002/0471142913.fab0102s00/abstract>
- Riccardi, C. et Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458-1461. doi:10.1038/nprot.2006.238
- Ristivojević, P., Andrić, F. L., Trifković, J. Đ., Vovk, I., Stanisavljević, L. Ž., Tešić, Ž. L. et Milojković-Opsenica, D. M. (2014). Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts: Classification of propolis. *Journal of Chemometrics*, 28(4), 301-310. doi:10.1002/cem.2592
- Robbins, K. S., Gong, Y., Wells, M. L., Greenspan, P. et Pegg, R. B. (2015). Reprint of “Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of U.S. pecans”. *Journal of Functional Foods*, 18, Part B, 1002-1013. doi:10.1016/j.jff.2015.05.026
- Roberts, H. M. (2017). *Neutrophil function in chronic inflammatory disease states* (PhD, University of Birmingham). Repéré à <http://theses.bham.ac.uk/7018/>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). Carotenes and xanthophylls as antioxidants. Dans F. Shahidi (dir.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 17-50). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00002-6
- Rohr, G. E. (1999). *Analytical investigation on and isolation of procyanidins from Crataegus leaves and flowers* (Doctoral Thesis, ETH Zurich). Repéré à <https://www.research-collection.ethz.ch/handle/20.500.11850/143997>
- Rouleau, R. (1979). *Petite flore forestière du Québec*. Québec ; Montréal : France-Amérique.
- Royer, M., Diouf, P. N. et Stevanovic, T. (2011). Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2180-2188. doi:10.1016/j.fct.2011.06.003
- Royer, M., Prado, M., García-Pérez, M. E., Diouf, P. N. et Stevanovic, T. (2013). Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition*, 1(4), 158-167. doi:10.1016/j.phanu.2013.05.001
- S**adik, C. D., Sies, H. et Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology*, 65(5), 773-781.
- Salimi, A., Roudkenar, M. H., Sadeghi, L., Mohseni, A., Seydi, E., Pirahmadi, N. et Pourahmad, J. (2015). Ellagic acid, a polyphenolic compound, selectively induces ROS-mediated apoptosis in cancerous B-lymphocytes of CLL patients by directly targeting mitochondria. *Redox Biology*, 6(Supplement C), 461-471. doi:10.1016/j.redox.2015.08.021
- Sampietro, D. A., Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., Quiroga, E. N. et Vattuone, M. A. (2009). Colorimetric Reactions. Dans *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/ Natural Products* (vol. 1-0, p. 73-101). Science Publishers. doi:10.1201/b10195-7
- Sankhalkar, S. et Vernekar, V. (2016). Quantitative and Qualitative analysis of Phenolic and Flavonoid content in *Moringa oleifera* Lam and *Ocimum tenuiflorum* L. *Pharmacognosy Research*, 8(1), 16. doi:10.4103/0974-8490.171095
- Santa, H. S. D., Romão, P. R. T., Sovrani, V., Oliveira, F. R., Peres, A. et Monteiro, M. C. (2015). Dietary Polysaccharides and Immune Modulation. Dans K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (dir.), *Polysaccharides* (p. 1991-2016). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16298-0_6
- Santori, L. S. (1981). *Oligosaccharide glycolipids in cultures of Acer pseudoplatanus* (Kansas State University). Repéré à <http://oatd.org/oatd/record?record=handle%5C%3A2097%5C%2F12849>

- Sarker, S. D. et Nahar, L. (2012a). An Introduction to Natural Products Isolation. Dans *Natural Products Isolation* (p. 1-25). Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_1
- Sarker, S. D. et Nahar, L. (2012b). Hyphenated Techniques and Their Applications in Natural Products Analysis. Dans *Natural Products Isolation* (p. 301-340). Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_12
- Savoie, A., Lavastre, V., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K. et Girard, D. (2000). Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(6), 845-853.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M. et Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1), 1-22. doi:10.1016/j.cis.2008.07.004
- Scalbert, A., Monties, B. et Janin, G. (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1324-1329. doi:10.1021/jf00089a026
- Schieber, A., Hilt, P., Conrad, J., Beifuss, U. et Carle, R. (2002). Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic endcapping. *Journal of Separation Science*, 25(5-6), 361-364. doi:10.1002/1615-9314(20020401)25:5/6<361::AID-JSSC361>3.0.CO;2-D
- Scott, S. J. et Hay, G. W. (1967). The carbohydrates of the roots of the sugar maple. *Canadian Journal of Chemistry*, 45(19), 2217-2225. doi:10.1139/v67-358
- Seeram, N. P., Ma, H. et Parang, K. (2015). Methods for Skin Whitening Using a Gallotannin. Repéré à <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015154074>
- Seeram, N. P., Xu, J., Li, L. et Slitt, A. (2012). Mining Red Maple (*Acer rubrum*) Trees for Novel Therapeutics to Manage Diabetes. *Medicine and health, Rhode Island*, 95(9), 283.
- Senge, M. O., Ryan, A. A., Letchford, K. A., MacGowan, S. A. et Mielke, T. (2014). Chlorophylls, Symmetry, Chirality, and Photosynthesis. *Symmetry*, 6(3), 781-843. doi:10.3390/sym6030781
- Shahidi, F. et Naczki, M. (2011). Analysis of Polyphenols in Foods. Dans *Methods of Analysis of Food Components and Additives, Second Edition* (vol. 1-0, p. 253-308). CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11218-12>
- Shang, N., Guerrero-Analco, J. A., Musallam, L., Saleem, A., Muhammad, A., Walshe-Roussel, B., ... Haddad, P. S. (2012). Adipogenic constituents from the bark of *Larix laricina* du Roi (K. Koch; Pinaceae), an important medicinal plant used traditionally by the Cree of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of type 2 diabetes symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 1051-1057. doi:10.1016/j.jep.2012.04.002
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295. doi:10.1016/S1367-5931(03)00020-6
- Shi, S., Ma, Y., Zhang, Y., Liu, L., Liu, Q., Peng, M. et Xiong, X. (2012). Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH-HPLC experiment. *Separation and Purification Technology*, 89, 225-233. doi:10.1016/j.seppur.2012.01.041
- Shon, H. K., Phuntsho, S., Chaudhary, D. S., Vigneswaran, S. et Cho, J. (2013). Nanofiltration for water and wastewater treatment – a mini review. *Drinking Water Engineering and Science*, 6(1), 47-53. doi:<https://doi.org/10.5194/dwes-6-47-2013>
- Sieniawska, E. et Baj, T. (2017). Tannins. Dans S. Badal et R. Delgoda (dir.), *Pharmacognosy* (p. 199-232). Boston : Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X
- Singh, I., Juneja, P., Kaur, B., Kumar, P., Singh, I., Juneja, P., ... Kumar, P. (2013). Pharmaceutical Applications of Chemometric Techniques, Pharmaceutical Applications of Chemometric Techniques. *International Scholarly Research Notices, International Scholarly Research Notices, 2013, 2013*, e795178. doi:10.1155/2013/795178, 10.1155/2013/795178
- Sitholé, B., Shirin, S. et Ambayec, B. (2010). Analysis and Fate of Lipophilic Extractives in Sulphite Pulps. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(1), 31-47. doi:10.1080/02773810903370404
- Skalicka-Woniak, K., Gowniak, K. et Widelski, J. (2008). Plant Materials in Modern Pharmacy and Methods of Their Investigations. Dans *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (vol. 1-0). CRC Press. Repéré à <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420046786.ch2>
- Smith, M. M., Axelos, M. et Péaud-Lenoël, C. (1976). Biosynthesis of mannan and mannolipids from GDP-Man by membrane fractions of sycamore cell cultures. *Biochimie*, 58(10), 1195-1211.

- Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A. et Weber, C. (2017). Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 248-261. doi:10.1038/nri.2017.10
- Spasevska, I. (2014). An outlook on bispecific antibodies: Methods of production and therapeutic benefits. *Biosci Master Rev*, 1-7.
- Sreevidya, N. et Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC international*, 86(6), 1124-1127.
- Stahl, E. et Glatz, A. (1982). Zur Farbreaktion der Anisaldehyd-Schwefelsäure als Reagenz in der Dünnschicht-Chromatographie. *Journal of Chromatography A*, 240(2), 518-521.
- Stecher, G., Mayer, R., Ringer, T., Hashir, M. A., Kasemsook, S., Qureshi, M. et Bonn, G. (2010). LC-MS as a Method of Identification and Quantification of Plant Metabolites. Dans *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis* (vol. 1-0, p. 257-285). CRC Press. doi:10.1201/b10320-13
- Stevanovic, T. et Perrin, D. (2009). *Chimie du bois*. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Sticher, O. (2008). Natural product isolation. *Natural Product Reports*, 25(3), 517-554. doi:10.1039/B700306B
- St-Pierre, F., Achim, A. et Stevanovic, T. (2013). Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Industrial Crops and Products*, 41, 179-187. doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.027
- Sun, J., Ma, H., Seeram, N. P. et Rowley, D. C. (2016). Detection of Inulin, a Prebiotic Polysaccharide, in Maple Syrup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7142-7147. doi:10.1021/acs.jafc.6b03139
- Swann, J. P. (2016). The history of efforts to regulate dietary supplements in the USA. *Drug Testing and Analysis*, 8(3-4), 271-282. doi:10.1002/dta.1919
- Swartz, M. (2005). UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253-1263. doi:10.1081/JLC-200053046
- Swartz, M. (2010). Hplc Detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150. doi:10.1080/10826076.2010.484356
- T**adema, H., Abdulahad, W., A Stegeman, C., Kallenberg, C. et Heeringa, P. (2011). Increased Expression of Toll-Like Receptors by Monocytes and Natural Killer Cells in ANCA-Associated Vasculitis. *PLoS one*, 6, e24315. doi:10.1371/journal.pone.0024315
- Tai, Z., Zhang, F., Cai, L., Shi, J., Cao, Q. et Ding, Z. (2012). Flavonol glycosides of *Pseudodrynaria coronans* and their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(2), 221-224. doi:10.1007/s10600-012-0209-1
- Tang, W. et Eisenbrand, G. (2013). *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*. Springer Science & Business Media.
- Taylor, J. S. et Dumbroff, E. B. (1975). Bud, root, and growth-regulator activity in *Acer saccharum* during the dormant season. *Canadian Journal of Botany*, 53(4), 321-331.
- Tecchio, C., Micheletti, A. et Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00508
- Thakur, M. L. (1977). Phenolic growth inhibitors isolated from dormant buds of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh). *Journal of Experimental Botany*, 28(4), 795-803.
- Torgils Fossen, Ø. M. A. (1999). Cyanidin 3-(2'',3''-digalloylglucoside) from red leaves of *Acer platanoides*. *Phytochemistry*, 52(8), 1697-1700. doi:10.1016/S0031-9422(99)00188-0
- Tung, N. H., Ding, Y., Kim, S. K., Bae, K. et Kim, Y. H. (2008). Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of the Chemical Components from the Stems of *Acer tegmentosum* Maxim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10510-10514. doi:10.1021/jf8020283
- U**madevi, I. et Daniel, M. (1991). Chemosystematics of the Sapindaceae. *Feddes Repertorium*, 102(7-8), 607-612. doi:10.1002/febr.19911020711
- V**an Hoyweghen, L., De Beer, T., Deforce, D. et Heyerick, A. (2012). Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species. *Phytochemical Analysis: PCA*, 23(5), 433-443. doi:10.1002/pca.1377

- Vardanega, R., Santos, D. T. et Meireles, M. A. A. (2014). Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy Reviews*, 8(16), 88-95. doi:10.4103/0973-7847.134231
- Vermeersch, M., Foubert, K., Luz, R. I. da, Puyvelde, L. V., Pieters, L., Cos, P. et Maes, L. (2009). Selective antileishmania activity of 13,28-epoxy-oleanane and related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy Research*, 23(10), 1404-1410. doi:10.1002/ptr.2788
- Vitasse, Y. (2009). *Déterminismes environnemental et génétique de la phénologie des arbres de climat tempéré: suivi des dates de débourrement et de sénescence le long d'un gradient altitudinal et en tests de provenances* (Thèse de doctorat). École doctorale des Sciences de l'environnement, Bordeaux, France.
- W**agner, H. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media.
- Wagner, H. (2011). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1), 34-37. doi:10.1016/j.fitote.2010.11.016
- Wall, P. E. (2005a). Detection and Visualisation. Dans *Thin-Layer Chromatography* (p. 134-153). doi:10.1039/9781847552464-00134
- Wall, P. E. (2005b). Development Techniques. Dans *Thin-Layer Chromatography* (p. 86-133). doi:10.1039/9781847552464-00086
- Wall, P. E. (2005c). Introduction and History. Dans *Thin-Layer Chromatography* (p. 1-5). doi:10.1039/9781847552464-00001
- Wall, P. E. (2005d). *Thin-layer chromatography: a modern practical approach*. Cambridge : Royal Society of Chemistry.
- Wallace, T. C. et Giusti, M. M. (2010). Evaluation of Parameters that Affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols and Proanthocyanidins. *Journal of Food Science*, 75(7), C619-C625. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01734.x
- Wan, C., Yuan, T., Li, L., Kandhi, V., Cech, N. B., Xie, M. et Seeram, N. P. (2012). Maplexins, new α -glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(1), 597-600. doi:10.1016/j.bmcl.2011.10.073
- Wan, C., Yuan, T., Xie, M. et Seeram, N. P. (2012). *Acer rubrum* phenolics include A-type procyanidins and a chalcone. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 1-3. doi:10.1016/j.bse.2012.04.005
- Wan, C. et Zhou, S. (2013). Phenolic constituents from twigs of *Acer rubrum* and their anti-oxidation and anti- α -glucosidase activities. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 44(11), 1391-1396.
- Wang, J., Yue, Y.-D., Tang, F. et Sun, J. (2012). TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of *Bambusa. textilis* McClure. *Molecules*, 17(10), 12297-12311. doi:10.3390/molecules171012297
- Wang, M., Zhao, S., Zhu, P., Nie, C., Ma, S., Wang, N., ... Zhou, Y. (2017). Purification, characterization and immunomodulatory activity of water extractable polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia*. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.062
- Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y. et Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960-968. doi:10.1021/jf1040977
- Watanaba, Y., Kamei, A., Shinozaki, F., Ishijima, T., Iida, K., Nakai, Y., ... Abe, K. (2011). Ingested Maple Syrup Evokes a Possible Liver-Protecting Effect—Physiologic and Genomic Investigations with Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(12), 2408-2410. doi:10.1271/bbb.110532
- Watanabe, M. et Devkota, H. P. (2017). Antioxidant Phenolic Constituents from the Leaves of *Acer ginnala* var *aidzuense*. *Journal of Natural Remedies*, 17(1), 9-12. doi:10.18311/jnr/2017/15632
- Westermann, C. M., van Leeuwen, R., van Raamsdonk, L. W. D. et Mol, H. G. J. (2016). Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(3), 880-884. doi:10.1111/jvim.13927
- Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8(5), 401-409. doi:10.1078/0944-7113-00060
- Wilson, E. G. (2009). HPLC and LC-MS. Dans *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/ Natural Products* (vol. 1-0, p. 135-174). Science Publishers. doi:10.1201/b10195-9

- Wink, M., Botschen, F., Gosmann, C., Schäfer, H. et Waterman, P. G. (2010). Chemotaxonomy Seen from a Phylogenetic Perspective and Evolution of Secondary Metabolism. Dans M. Winkessor (dir.), *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* (p. 364-433). Wiley-Blackwell. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444320503.ch7/summary>
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. et Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation*, 80(5), 617-653. doi:10.1038/labinvest.3780067
- Wlodkowic, D., Skommer, J. et Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 559, 19-32. doi:10.1007/978-1-60327-017-5_2
- Wolfe, K. L. et Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896-8907. doi:10.1021/jf0715166
- Wright, H. L., Moots, R. J., Bucknall, R. C. et Edwards, S. W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(9), 1618-1631. doi:10.1093/rheumatology/keq045
- Wu, D., Wu, X.-D., You, X.-F., Ma, X.-F. et Tian, W.-X. (2010). Inhibitory effects on bacterial growth and b-ketoacyl-ACP reductase by different species of maple leaf extracts and tannic acid. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S35-S41. doi:10.1002/ptr.2873
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. et Prior, R. L. (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4069-4075. doi:10.1021/jf0603001
- Wu, Z.-Y., Wang, T., Meng, Y.-S., Rao, Y., Wang, B.-W., Zheng, J., ... Zhang, J.-L. (2017). Enhancing the reactivity of nickel(II) in hydrogen evolution reactions (HERs) by β -hydrogenation of porphyrinoid ligands. *Chemical Science*. doi:10.1039/C7SC02073B
- X**iao, W., Lei, F., Hengqiang, Z. et Xiaojing, L. (2013). Isolation and Purification of Natural Products. Dans *Natural Product Extraction* (p. 314-362). doi:10.1039/9781849737579-00314
- Xiong, Q., Wilson, W. K. et Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42(1), 87-96. doi:10.1007/s11745-006-3013-5
- Y**ang, F. Q., Wang, H. K., Chen, H., Chen, J. D. et Xia, Z. N. (2011). Fractionation of Volatile Constituents from *Curcuma* Rhizome by Preparative Gas Chromatography. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2011, 1-6. doi:10.1155/2011/942467
- Yoshikawa, K., Kawahara, Y., Arihara, S. et Hashimoto, T. (2011). Aromatic compounds and their antioxidant activity of *Acer saccharum*. *Journal of Natural Medicines*, 65(1), 191-193. doi:10.1007/s11418-010-0450-5
- Yoshikawa, K., Tani, S., Baba, C. et Hashimoto, T. (2013). Phenylpropanoid, Sapnol A, Lignan and Neolignan Sophorosides, Saposides A and B, Isolated from Canadian Sugar Maple Sap. *Molecules*, 18(8), 9641-9649. doi:10.3390/molecules18089641
- Yu, D., Xu, F., Zeng, J. et Zhan, J. (2012). Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life*, 64(4), 285-295. doi:10.1002/iub.1005
- Yuan, T., Li, L., Zhang, Y. et Seeram, N. P. (2013). Pasteurized and sterilized maple sap as functional beverages: Chemical composition and antioxidant activities. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1582-1590. doi:10.1016/j.jff.2013.06.009
- Yuan, T., Wan, C., González-Sarrías, A., Kandhi, V., Cech, N. B. et Seeram, N. P. (2011). Phenolic Glycosides from Sugar Maple (*Acer saccharum*) Bark. *Journal of Natural Products*, 74(11), 2472-2476. doi:10.1021/np200678n
- Yuan, T., Wan, C., Liu, K. et Seeram, N. P. (2012). New maplexins F–I and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron*, 68(4), 959-964. doi:10.1016/j.tet.2011.11.062
- Z**hang, Y., Ma, H., Yuan, T. et Seeram, N. P. (2015). Red Maple (*Acer rubrum*) Aerial Parts as a Source of Bioactive Phenolics. *Natural Product Communications*, 10(8), 1409-1412.
- Zhang, Y., Yuan, T., Li, L., Nahar, P., Slitt, A. et Seeram, N. P. (2014). Chemical Compositional, Biological, and Safety Studies of a Novel Maple Syrup Derived Extract for Nutraceutical Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6687-6698. doi:10.1021/jf501924y

- Zhao, Y., Dou, J., Wu, T. et Aisa, H. A. (2013). Investigating the Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibition Activities of *Gossypium herbaceum*. *Molecules*, *18*(1), 951-962. doi:10.3390/molecules18010951
- Zheleva-Dimitrova, D., Balabanova, V., Gevrenova, R., Doichinova, I. et Vitkova, A. (2015). Chemometrics-based approach in analysis of *Arnicae flos*. *Pharmacognosy Magazine*, *11*(44), 538. doi:10.4103/0973-1296.172958
- Zhong, Y. et Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Dans *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 287-333). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9
- Zimmermann, M. et Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 57-63. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_8