

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE RÉALISÉE À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU PROGRAMME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

DE L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

OFFERT PAR EXTENSION À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

PAR

FRANÇOIS SIMARD, M.Sc.

ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE DÉRIVÉS DE
DIHYDROCHALCONES HYDROXYCINNAMYLÉS ISSUS DE BOURGEONS DE *POPULUS BALSAMIFERA* L.

DÉCEMBRE 2013

RÉSUMÉ

L'augmentation rapide de l'apparition de résistances contre les antibiotiques utilisés chez l'humain dans le traitement des infections bactériennes est une menace grave pour la santé de la population. Ces résistances nuisent à l'efficacité des traitements ce qui a pour effet d'aggraver les symptômes et d'augmenter les risques de mortalité associés à ces infections. Seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques ont vu le jour au cours des 50 dernières années laissant présager que cette situation problématique continuera d'évoluer dans les années à venir. Il est urgent d'explorer différentes stratégies potentielles qui pourraient mener à la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques. En ce sens, l'étude des métabolites secondaires issus des plantes constitue une stratégie intéressante puisque cette source a jusqu'à maintenant été peu exploitée et ce, malgré l'intensive utilisation des plantes pour traiter les infections en médecine traditionnelle de nombreuses régions du monde. En Amérique, les peuples autochtones utilisaient les bourgeons de *Populus balsamifera* pour préparer différents remèdes à appliquer sur les coupures, les brûlures ou d'autres blessures prédisposant aux infections. Cette utilisation traditionnelle a incité le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) à évaluer le potentiel de cette matrice végétale à inhiber la croissance bactérienne. Dans le cadre de cette étude, l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* a montré un excellent potentiel antibactérien avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) face à *Staphylococcus aureus* de 12,5 µg/ml.

Cette thèse présente le fractionnement bioguidé par l'activité antibactérienne ainsi que les travaux accomplis concernant l'isolement et la caractérisation des composés présents dans les fractions actives obtenues. De plus, l'activité antibactérienne *in vitro* des composés isolés a été évaluée contre *S. aureus* et plusieurs souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM).

Les travaux effectués sur une première fraction active ont d'abord mené à l'isolement et la caractérisation de trois dihydrochalcones substituées par un groupement hydroxycinnamyle. Ces trois nouveaux produits naturels ont été nommés balsacones A, B et C et l'évaluation de leur activité antibactérienne a permis de démontrer que ces trois composés inhibaient efficacement la croissance de *S. aureus* avec des CMI variant entre 3,1 et 6,3 µM après 6 h d'incubation.

Les travaux d'isolement menés sur une seconde fraction active ayant mené à l'identification de 6 nouvelles balsacones (D-I) sont ensuite présentés. Ces nouvelles balsacones sont aussi constituées de dihydrochalcones substituées par une unité hydroxycinnamyle cyclisée avec un des groupements phénoliques des dihydrochalcones formant un hétérocycle pyranique. L'absence d'activité chiroptique malgré la présence de stéréocentres sur l'hétérocycle pyranique a conduit à la conclusion que les balsacones D-I étaient racémiques. Leur purification par HPLC en utilisant un support chiral a donc été entreprise ce qui a permis d'obtenir les paires d'énantiomères (-) et (+) pour chacun des mélanges racémiques. La configuration absolue des énantiomères a pu être déterminée grâce à des analyses de diffraction de rayon X sur la (-)-balsacone D ainsi que par la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux à des spectres calculés à partir de fondements théoriques. L'activité antibactérienne des énantiomères purifiés a été évaluée contre *S. aureus*. La (-)-balsacone D et la (+)-balsacone D étaient les composés les plus actifs avec des CMI de 6.25 µM dans les deux cas.

Des travaux d'isolement plus approfondis ont ensuite conduit à l'identification des balsacones J et K. Ces deux nouveaux composés possèdent une structure inusitée hybride entre des dihydrochalcones et le cinnamate d'hydroxycinnamyle. Il s'est avéré que les balsacones J et K étaient aussi des composés racémiques et leur purification par HPLC en utilisant un support chiral a été effectuée. La configuration absolue des paires d'énantiomères obtenues n'a malheureusement pas pu être déterminée dans le cadre de cette thèse, mais des travaux sont toujours en cours afin d'y parvenir. Les mélanges racémiques des balsacones J et K ainsi que les paires d'énantiomères obtenues à partir de ces deux mélanges ont montré des activités antibactériennes modérées avec des CMI variant entre 25 et 50 μM .

La poursuite des travaux d'isolement sur les fractions actives obtenues de l'extrait de *P. balsamifera* ont ensuite permis d'identifier les balsacones L, M, N et O ainsi que l'iryrantherin-D. Ces cinq composés possédaient des structures similaires à celles des balsacones D-I sur lesquelles une unité hydroxycinnamyle supplémentaire était présente. La nature racémique de ces cinq composés a encore une fois rendu nécessaire la mise au point de méthodes de séparation par HPLC en utilisant un support chiral. La configuration absolue des paires d'énantiomères obtenues a été déterminée grâce à des analyses de diffraction de rayon X et en utilisant des spectres de dichroïsme circulaire calculés à partir de la théorie de la fonctionnelle de la densité. La (\pm)-balsacone N ainsi que les deux énantiomères (+) et (-) ont montré une activité antibactérienne marquée avec des CMI respectives de 3,13, 3,13 et 1,56 μM .

L'isolement et la caractérisation des balsacones P-W complètent la description des travaux d'isolement effectués dans le cadre de cette thèse. La balsacone P était un isomère structural de la balsacone L dont l'hétérocycle pyranique avait été formé par une fonction phénolique différente de l'unité dihydrochalcone. La balsacone Q s'est avérée être l'iryrantherin-D sur laquelle un groupement hydroxycinnamyle supplémentaire était présent. La structure des balsacones R-W était pour leur part caractérisée par la présence de deux hétérocycles pyraniques fusionnés sur le même cycle aromatique d'une unité dihydrochalcone. Les balsacones P-W ont aussi été obtenues sous la forme de mélanges racémiques. La purification chirale des balsacones T-W a pu être effectuée, mais la détermination de la configuration absolue des énantiomères obtenus n'a pu être complétée dans le cadre de cette thèse. L'évaluation de l'activité antibactérienne des mélanges racémiques a permis de montrer que les balsacones Q et R étaient actives avec des CMI de 6.25 μM dans les deux cas.

Cette thèse se conclut par la présentation des résultats d'activité antibactérienne *in vitro* sur dix souches de SARM isolées en clinique. Ces résultats ont permis de montrer le fort potentiel antibactérien des balsacones C, D, E, L, N, O, P, R et S, dont l'activité antibactérienne contre les souches de SARM était similaire à celle observée contre *S. aureus* sensible (CMI variant entre 0.78 μM et 6.25 μM). Ces résultats ont finalement permis d'émettre certaines hypothèses quant aux relations entre la structure des balsacones et leur activité antibactérienne.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord et avant tout remercier mon directeur de thèse, le professeur André Pichette. C'est grâce à lui si j'ai développé une passion pour la recherche. Il a été un modèle et une inspiration tout au long de mon cheminement académique. Il s'est investi sans relâche pour s'assurer que tous les éléments nécessaires à la réussite de ce projet soient réunis. Sous sa direction, j'ai eu la chance d'avoir accès à de l'équipement moderne et d'acquérir des connaissances approfondies dans plusieurs domaines associés aux produits naturels. C'est aussi grâce à ses précieux conseils que ce projet de thèse a pu être complété. Notre association dans le cadre de mes études de doctorat a toujours été agréable et amicale ce qui a permis d'en faire une expérience dont je garderai de très bons souvenirs. J'espère que le dépôt de cette thèse n'est pas la fin, mais seulement une autre étape de cette collaboration si enrichissante.

J'aimerais ensuite remercier mon codirecteur, le professeur Jean Legault, pour sa contribution dans la réussite de ma formation. Sa bonne humeur et sa passion jamais dissimulée ont été très appréciées dans les moments difficiles de mes études de doctorat. Sa direction et ses conseils ont été essentiels pour la réalisation des travaux d'activité biologique et pour la rédaction des manuscrits des différents articles.

Je dois aussi formuler mes sincères remerciements à mon collègue, et ami, Serge Lavoie qui a été en quelque sorte mon mentor, et ce, depuis mes débuts dans un laboratoire de recherche. Grâce à sa débrouillardise, son travail acharné et sa soif de nouvelles connaissances, Serge a été une ressource inestimable sans qui je n'aurais jamais pu compléter cette thèse.

Une autre personne qui a contribué de près à ma formation est le professeur Vakhtang Mshvildadze. Je me dois de lui manifester ma gratitude pour m'avoir initié à l'art de la purification d'extraits de plantes. Sans l'apport de son expérience, les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche n'auraient pas la même ampleur. Je tiens aussi à souligner le plaisir que j'ai eu et que j'ai encore à le côtoyer.

La réalisation des travaux de laboratoire dans le cadre de ce projet aurait été impossible sans le dévouement de toute une équipe. Je tiens à mentionner particulièrement le soutien de Carole Grenon sans qui il aurait été impossible de surmonter tous les problèmes auxquels nous avons constamment été confrontés au laboratoire. Je dois aussi remercier Carole pour son soutien moral qui a été très apprécié dans les moments de découragement. Catherine Dussault a accompli un travail phénoménal pour effectuer tous les tests d'activité antibactérienne et je lui en suis très reconnaissant. Je souhaiterais aussi remercier les étudiants de maîtrise, de baccalauréat et les stagiaires qui ont participé à différents degrés aux travaux réalisés dans le cadre de ce projet, soit Éric Chiasson, Dorianne Avezard, Alexis St-Gelais, Hubert Marceau, Estelle Juère et Kim Duchesne. Je désirerais aussi souligner la contribution, de près ou de loin, de tous les collègues que j'ai côtoyés au cours des années au LASEVE dont Hélène Gagnon, Karl Girard-Lalancette, Tommy Perron, Sylvain Mercier, Marianne Boucher, Balla Sylla, Maria Deshayes ainsi que tous ceux que je pourrais avoir oublié de mentionner.

Je tiens à remercier François Otis et Normand Voyer du laboratoire PROTEO de l'Université Laval pour m'avoir permis d'effectuer les analyses de dichroïsme circulaire tout en me fournissant l'aide nécessaire. Les calculs théoriques de spectres de dichroïsme circulaire ont pu être effectués grâce à l'utilisation de ressources informatiques fournies par Westgrid et Calcul Canada.

Je remercie également les organismes subventionnaires qui m'ont épaulé financièrement par l'octroi de bourses d'excellence, c'est-à-dire le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie du Canada (CRSNG), le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et la fondation de l'UQAC.

Je termine sur une note plus personnelle en remerciant ma conjointe Marie-Pier pour sa patience, son réconfort et son soutien au cours de ces années passées à étudier. Je remercie aussi mon père Marc qui m'a toujours encouragé à continuer et qui m'a transmis des valeurs qui me sont aujourd'hui si utiles dans

tout ce que je vis. Je remercie enfin tous mes amis et ma famille avec qui j'ai passé de beaux moments durant ces années de dur labeur.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ANNEXES	XV
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 LA PROBLÉMATIQUE GLOBALE DES MALADIES INFECTIEUSES	1
1.2 LES ANTIBIOTIQUES ET LE PHÉNOMÈNE DE RÉSISTANCE.....	2
1.3 LE RALENTISSEMENT DE LA MISE EN MARCHÉ DE NOUVELLES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES.....	5
1.4 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES ISSUS DES PLANTES, UNE SOURCE POTENTIELLE D'ANTIBACTÉRIENS	6
1.5 LES BOURGEONS DE <i>POPULUS BALSAMIFERA</i> , UNE MATRICE D'INTÉRÊT DANS LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS	8
1.6 OBJECTIFS ET PLAN DE LA THÈSE	10
CHAPITRE 2.....	15
NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM CANADIAN BOREAL FOREST	15
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....	15
RÉSUMÉ.....	16
INTRODUCTION.....	17
IDENTIFICATION OF NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM CANADIAN BOREAL FOREST.....	20
<i>Selection of plant species and bioguided isolation process</i>	<i>20</i>
<i>Diarylheptanoids from the inner bark Betula papyrifera</i>	<i>21</i>
<i>Labdane diterpenes from Larix laricina.....</i>	<i>24</i>
<i>Phenolic compounds from Populus tremuloides buds</i>	<i>25</i>
<i>Sesquiterpenes from Abies balsamea</i>	<i>27</i>
CHEMICAL MODIFICATION OF BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM THE CANADIAN BOREAL FOREST.....	30
<i>Glycosidation of triterpenoids from outer bark of B. papyrifera.....</i>	<i>31</i>

CONCLUSION	35
CHAPITRE 3.....	38
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	38
3.1 LE GENRE <i>POPULUS</i> ET LE PEUPLIER BAUMIER (<i>POPULUS BALSAMIFERA</i> L.).....	38
3.1.1 <i>Taxinomie, morphologie, habitat et distribution</i>	38
3.1.2 <i>Génétique et génomique</i>	41
3.1.3 <i>Utilisations commerciales actuelles et potentielles</i>	42
3.1.4 <i>Utilisations médicinales traditionnelles</i>	43
3.1.5 <i>Composition chimique des extractibles du genre Populus</i>	46
3.1.6 <i>Composition chimique des extractibles de P. balsamifera</i>	58
3.1.7 <i>Activités biologiques</i>	64
3.2 LA PROPOLIS	66
3.3 LES DÉRIVÉS DE DIHYDROCHALCONES ET LEUR ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE	67
CHAPITRE 4.....	70
NEW ANTIBACTERIAL DIHYDROCHALCONE DERIVATIVES FROM BUDS OF <i>POPULUS BALSAMIFERA</i>.....	70
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....	70
RÉSUMÉ GRAPHIQUE	71
RÉSUMÉ	71
ABSTRACT	71
INTRODUCTION.....	72
RESULTS AND DISCUSSION.....	72
ACKNOWLEDGMENTS	75
SUPPLEMENTARY MATERIAL	75
EXPERIMENTAL PART	79
<i>General Experimental Procedures</i>	79
<i>Plant material</i>	79
<i>Extraction and isolation</i>	80
<i>Evaluation of antibacterial activity</i>	82
CHAPITRE 5.....	83
BALSACONES D-I, DIHYDROCINNAMOYL FLAVANS FROM <i>POPULUS BALSAMIFERA</i> BUDS.....	83

CONTRIBUTION DES AUTEURS	83
RÉSUMÉ GRAPHIQUE	84
RÉSUMÉ.....	84
ABSTRACT	84
INTRODUCTION.....	85
RESULTS AND DISCUSSION.....	86
<i>Structural determination</i>	86
<i>Proposed biosynthetic pathway</i>	91
<i>Antibacterial activity and cytotoxicity of enantiomers pairs from 149-154</i>	92
CONCLUDING REMARKS.....	93
EXPERIMENTAL.....	93
<i>General</i>	93
<i>Plant material</i>	94
<i>Extraction and isolation</i>	94
<i>Detection of compounds 149-154 in a cold solvent extract</i>	96
<i>Physical data of new compounds</i>	96
<i>X-ray crystal structure analysis of (-)-balsacone D [(-)-149]</i>	98
<i>Conformational analysis, geometrical optimization and ECD calculation</i>	98
<i>Antibacterial activity</i>	99
<i>Cytotoxicity</i>	99
ACKNOWLEDGMENTS	99
APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA	100
CHAPITRE 6.....	108
BALSACONE J AND K: ANTIBACTERIAL HYDROXYCINNAMATE ESTER-SUBSTITUTED DIHYDROCHALCONES AS RACEMATES FROM <i>POPULUS BALSAMIFERA</i> BUDS	108
CONTRIBUTION DES AUTEURS	108
RÉSUMÉ GRAPHIQUE	109
RÉSUMÉ.....	109
ABSTRACT	109
INTRODUCTION.....	110
RESULTS AND DISCUSSION	110
ACKNOWLEDGMENT.....	113

SUPPORTING INFORMATION.....	113
EXPERIMENTAL SECTION.....	113
<i>General Experimental Procedures</i>	113
<i>Plant Material</i>	114
<i>Extraction and Isolation</i>	114
<i>Bioassays</i>	116
CHAPITRE 7.....	121
BALSACONE L-O, ANTIBACTERIAL HYDROXYCINNAMYLATED DIHYDROCHALCONES FROM <i>POPULUS</i>	
<i>BALSAMIFERA</i> BUDS.....	
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	122
RÉSUMÉ.....	122
ABSTRACT.....	122
INTRODUCTION.....	123
RESULTS AND DISCUSSION.....	124
EXPERIMENTAL SECTION.....	129
<i>General Experimental Procedures</i>	129
<i>Plant Material</i>	129
<i>Extraction and Isolation</i>	130
<i>X-ray diffraction crystal structure analysis of (-)-157</i>	132
<i>Conformational analysis, geometrical optimization and ECD calculation for (2S,3S)-157, (2S,3S)-158, (2S,3S)-159 and (2S,3S)-160</i>	132
<i>Bacterial Growth Inhibition Assay</i>	133
<i>Cytotoxicity Assay</i>	133
ACKNOWLEDGMENTS.....	134
SUPPORTING INFORMATION.....	134
CHAPITRE 8.....	142
ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES BALSACONES P À	
W.....	
INTRODUCTION.....	142
RESULTS AND DISCUSSION.....	143
<i>Structural determination</i>	143

<i>Proposed biosynthetic pathway</i>	149
<i>Antibacterial activity and cytotoxicity of isolated compounds</i>	150
EXPERIMENTAL.....	150
<i>General</i>	150
<i>Plant material</i>	151
<i>Extraction and isolation</i>	151
<i>Physical data of new compounds</i>	153
<i>Antibacterial activity</i>	155
<i>Cytotoxicity</i>	155
ACKNOWLEDGMENTS	155
SUPPLEMENTARY DATA	155
CHAPITRE 9	163
ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES BALSACONES ISOLÉES SUR DES SOUCHES DE SARM	163
RÉSULTATS ET DISCUSSION	163
PARTIE EXPÉRIMENTALE	168
<i>Isolation et identification des souches de SASM et de SARM</i>	168
<i>Test de susceptibilité des souches de SARM par la méthode de diffusion sur disque</i>	169
<i>Évaluation de l'activité antibactérienne des balsacones sur les souches de SASM et de SARM</i>	169
CHAPITRE 10	171
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	171
RÉFÉRENCES	178
ANNEXE 1	192
PRINCIPES DES TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES UTILISÉES	192
SPECTROSCOPIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE	192
CALCULS DE SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	193
ANNEXE 2	195
SPECTRE RMN ¹H ET ¹³C	195
ANNEXE 3 ORGANIGRAMME REPRÉSENTANT LA MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT 1	251
ANNEXE 4 ORGANIGRAMME REPRÉSENTANT LA MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT 2	252

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: PHENOLIC COMPOUNDS FROM <i>B. PAPYRIFERA</i> INNER BARK AND CURCUMIN	24
FIGURE 2: COMPOUNDS ISOLATED FROM <i>L. LARICINA</i> BARK AND OTHER BIOACTIVE LABDANE DITERPENES.	25
FIGURE 3: HYDROXYCINNAMIC ACID DERIVATIVES FROM <i>POPULUS</i> SPP AND PROPOLIS.	27
FIGURE 4: A-HUMULENE (26), B-CARYOPHYLLENE (27), PACLITAXEL (28) AND A-PINENE (29).	30
FIGURE 5: LUPANE-TYPE TRITERPENES, SAPONINS AND NON-NATURAL SAPONINS.....	35
FIGURE 6: CHATONS DE <i>P. TREMULA</i> (A) ET BOURGEONS LATÉRAUX DE <i>P. TRICHOCARPA</i> (B)	40
FIGURE 7: CARTE DE LA DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DE <i>P. BALSAMIFERA</i>	41
FIGURE 8: EXTRAIT DE L'ARTICLE DE HENRI BRAGONNOT RELATANT L'ISOLEMENT DE LA POPULINE POUR LA PREMIÈRE FOIS (A) ET STRUCTURES DE LA SALICYLINE (41) ET DE LA POPULINE (42) (B).....	48
FIGURE 9: BIOSYNTHÈSE DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES ET DE LEURS ESTERS DE QUINATE.....	49
FIGURE 10: STRUCTURES DES GLYCOSIDES PHÉNOLIQUES DÉRIVÉS DE LA SALICYLINE	53
FIGURE 11: CLASSES DE FLAVONOÏDES CONTENUES DANS LES ESPÈCES DU GENRE <i>POPULUS</i>	55
FIGURE 12: STRUCTURE GÉNÉRALE DES PROANTHOCYANIDINES ET RÉSULTATS DE LA THIOLYSE	57
FIGURE 13: LE (-)-GERMACRÈNE D (71) ET LE (E,E)- α -FARNÉSÈNE (72)	58
FIGURE 14: STRUCTURES DE DÉRIVÉS DE DIHYROCHALCONES POSSÉDANT DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES	69
FIGURE 15: STRUCTURE OF COMPOUNDS 1-3 , 43 , 44 , 75-78 AND 80	78
FIGURE 16: COSY, HMBC, NOESY AND MS KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 1	78
FIGURE 17: STRUCTURES OF 149-154	101
FIGURE 18: HMBC, COSY, NOESY AND MS KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 149	102
FIGURE 19: SINGLE CRYSTAL X-RAY STRUCTURE OF (-)- 149	102
FIGURE 20: EXPERIMENTAL ECD SPECTRA FOR COMPOUNDS 149-154 AND CALCULATED (TDDFT AT THE B3LYP/6- 311G(2D,2P) LEVEL) EDC SPECTRA OF COMPOUNDS (2S)- 149 , (2S)- 150 , (2S)- 151 , (2R,3S)- 152 , (2R,3S)- 153 AND (2R,3S)- 154	103

FIGURE 21: PROPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY.....	104
FIGURE 22: HPLC-MS-SIM CHROMATOGRAM TRACE OF FRACTION II OBTAINED FROM A COLD SOLVENT EXTRACT.....	105
FIGURE 23: STRUCTURES OF 155 AND 156	117
FIGURE 24: HMBC, COSY AND MS KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 155	117
FIGURE 25: EXPERIMENTAL ECD SPECTRA FOR COMPOUNDS (-)- 155 , (+)- 155 , (-)- 156 AND (+)- 156	118
FIGURE 26: POSSIBLE BIOSYNTHETIC PATHWAY FOR 155 AND 156	118
FIGURE 27: STRUCTURES OF COMPOUNDS 157-161	135
FIGURE 28: HMBC, COSY, NOESY AND MS KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 157	136
FIGURE 29: SINGLE CRYSTAL X-RAY STRUCTURE OF (-)- 157	136
FIGURE 30: EXPERIMENTAL ECD SPECTRA FOR COMPOUNDS 157-159 AND CALCULATED (TDDFT AT THE B3LYP/6-311G(2D,2P) LEVEL) EDC SPECTRA OF COMPOUNDS 157-(2S,3S) , 158-(2S,3S) AND 159-(2S,3S)	137
FIGURE 31: PROPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY.....	138
FIGURE 32: STRUCTURE OF COMPOUNDS 162-169	156
FIGURE 33: HMBC, COSY, NOESY KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 163	157
FIGURE 34: HMBC, COSY, NOESY KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 164	157
FIGURE 35: HMBC, COSY, NOESY KEY DATA FOR IDENTIFICATION OF COMPOUND 166	158
FIGURE 36: EXPERIMENTAL ECD SPECTRA FOR COMPOUNDS 166A , 166B , 167A , 167B , 168A , 168B , 169A AND 169B	159
FIGURE 37: STRUCTURES DES BALSACONES ISOLÉES QUI ONT ÉTÉ TESTÉES <i>IN VITRO</i> CONTRE LES SOUCHES DE SARM.	166

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: PRINCIPALES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES AVEC LEUR ANNÉE D'APPROBATION APPROXIMATIVE POUR L'UTILISATION CLINIQUE, L'ORIGINE DU "LEAD" ET QUELQUES EXEMPLES DE MÉDICAMENTS ¹	3
TABLEAU 2: ORGANISMES RÉSISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES IDENTIFIÉS CHEZ DES PATIENTS D'HÔPITAUX CANADIENS EN 2008 ¹	4
TABLEAU 3: ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DES BALSACONES A, B ET C	10
TABLEAU 4: CLASSIFICATION DES ESPÈCES DE POPULUS SELON LES SECTIONS DU GENRE (ECKENWALDER 1996)	38
TABLEAU 5: COMPILATION DES UTILISATIONS EN MÉDECINE TRADITIONNELLE DE <i>P. BALSAMIFERA</i>	45
TABLEAU 6: DISTRIBUTION DE CERTAINS ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES ET LEURS ESTERS DANS DIFFÉRENTES ESPÈCES DU GENRE <i>POPULUS</i> . ^A	51
TABLEAU 7: COMPOSITION EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES EXTRACTIBLES DE <i>P. BALSAMIFERA</i> , AVEC LEUR SOURCE	59
TABLEAU 8: TERPÈNES VOLATILES ISSUS DES BOURGEONS DE <i>P. BALSAMIFERA</i>	63
TABLE 9: ¹ H (400 MHz) AND ¹³ C (100 MHz) NMR DATA FOR BALSACONES A (1), B(2) AND C (3) IN CDCl ₃	76
TABLE 10: ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF COMPOUNDS 1-3, 43, 44, 75-78 AND 80	77
TABLE 11: ¹ H NMR SPECTROSCOPIC DATA OF COMPOUNDS 149 TO 154 IN ACETONE-D ₆ (400 MHz)	105
TABLE 12: ¹³ C NMR SPECTROSCOPIC DATA OF COMPOUNDS 149 TO 154 IN ACETONE-D ₆ (100 MHz)	106
TABLE 13: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF ENANTIOMERS OF COMPOUNDS 149-154	107
TABLE 14: NMR DATA OF 155 AND 156 (ACETONE-D ₆ , δ IN PPM, J IN Hz).	119
TABLE 15: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF 155 AND 156	120
TABLE 16: ¹ H NMR SPECTROSCOPIC DATA FOR COMPOUNDS 157 TO 161 IN ACETONE-D ₆ (400 MHz)	139
TABLE 17: ¹³ C NMR OF COMPOUNDS 157 TO 161 IN ACETONE-D ₆ (100 MHz)	140
TABLE 18. ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF COMPOUNDS 157-161	141
TABLE 19: ¹ H AND ¹³ C NMR SPECTROSCOPIC DATA OF COMPOUNDS 162-165 (100 MHz)	160
TABLE 20: ¹³ C AND ¹ H NMR SPECTROSCOPIC DATA OF COMPOUNDS 166-169 IN ACETONE-D ₆ (100 MHz)	161
TABLE 21: ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF COMPOUNDS 162-169	162

TABLEAU 22: ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES COMPOSÉS ISOLÉS CONTRE UNE SOUCHE DE <i>S. AUREUS</i> SENSIBLE ET DIX SOUCHES DE SARM AINSI QUE LA CYTOTOXICITÉ SUR UNE SOUCHE DE FIBROBLASTES DE PEAU HUMAINE (WS1).....	164
--	-----

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1:	Principes des techniques et méthodologies utilisées	192
Annexe 2:	Spectre RMN ^1H et ^{13}C des balsacones	195
Annexe 3:	Organigramme représentant la méthode de fractionnement 1	251
Annexe 4:	Organigramme représentant la méthode de fractionnement 2	252

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 LA PROBLÉMATIQUE GLOBALE DES MALADIES INFECTIEUSES

Dans les sociétés modernes, améliorer l'état de santé de la population est une priorité. La recherche de nouveaux traitements pour les pathologies dont les incidences et les taux de mortalité sont les plus élevés est une contribution importante à l'atteinte de cet objectif. Historiquement, les maladies infectieuses sont toujours demeurées parmi les causes de mortalité les plus importantes. Au début des années 1900, les trois plus grandes causes de décès aux États-Unis étaient trois maladies infectieuses; la pneumonie, la tuberculose et les gastro-entérites. Au cours du vingtième siècle, une meilleure application des principes d'hygiène dans la société et l'apparition de vaccins ont permis de grandement réduire la transmission des maladies infectieuses. Les taux de mortalité associés à plusieurs de ces maladies ont aussi constamment diminués jusqu'à la fin des années 1970 et ce, grâce à l'apparition de nouveaux traitements efficaces (Hughes 2001). Cependant, cette situation est surtout la réalité des pays développés puisqu'une partie importante de la population mondiale vit toujours dans des conditions favorisant la transmission de maladies infectieuses mortelles. De plus, l'accès aux vaccins et traitements qui existent est encore limité dans plusieurs pays en voie de développement. Les maladies infectieuses demeurent donc problématique pour une grande partie de la population mondiale si bien qu'il est estimé que près de 25 % des décès

recensés dans le monde sont encore aujourd'hui causés par des maladies infectieuses (Fauci et Morens 2012).

Depuis de le début des années 1980, une recrudescence du taux de mortalité associé aux maladies infectieuses a été observée et ce même dans les pays développés (Hughes 2001). L'apparition de nouvelles maladies infectieuses émergentes et la réémergence de maladies connues ayant acquises des résistances aux traitements utilisés ont été identifiées parmi les causes importantes de cette recrudescence. Le phénomène de résistance des organismes microbiens face aux traitements qui ont été développés prend rapidement de l'ampleur et vient nous rappeler que la lutte contre les maladies infectieuses n'est pas terminée. La résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections bactériennes est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la menace la plus importante pour le succès des traitements antimicrobiens (Abreu et al. 2012).

1.2 LES ANTIBIOTIQUES ET LE PHÉNOMÈNE DE RÉSISTANCE

Dans la deuxième moitié du vingtième siècle, la médecine a été révolutionnée par la découverte des premiers antibiotiques efficaces dans le traitement des infections bactériennes. En 1928, Alexander Flemming a découvert la pénicilline à partir d'une colonie de champignons de l'espèce *Penicillium notatum*. Flemming avait par hasard remarqué que la croissance de bactéries avait été inhibée autour des colonies de ce champignon (Ligon 2004). La découverte de Flemming allait devenir l'élément déclencheur de cette révolution. En effet, le métabolisme secondaire des microorganismes a été et demeure la principale source d'inspiration pour la mise au point de nouveaux antibiotiques. Entre 1940 et 1960, une vingtaine de nouvelles classes d'antibiotiques ont vu le jour (tableau 1). La majorité de celles-ci a été découverte grâce à l'étude de microorganismes produisant des métabolites avec des propriétés antibactériennes marquées.

Tableau 1: Principales classes d'antibiotiques avec leur année d'approbation approximative pour l'utilisation clinique, l'origine du "lead" et quelques exemples de médicaments¹

Classes d'antibiotiques	Introduction	Provenance	Exemples
Sulphonamides	1935	Synthétique	Sulfapyridine
β-lactames	1941	<i>Penicillium notatum</i>	Pénicilline, méthicilline
Sous classes			
Carbapénèmes	1984 ²	<i>Streptomyces cattleya</i>	Imipenem, meropenem
Monobactames	1986	Synthétique	Azteronam
Aminoglycosides	1944	<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin
Céphalosporines	1945	Genre <i>Acremonium</i>	Cephalothin, cephalirin
Chloramphénicol	1949	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphénicol
Tétracyclines	1950	Genre <i>Streptomyces</i>	Tétracycline
Lincosamides	1952	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lyncomycin
Macrolides	1952	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin
Streptogramines	1952	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Virginiamycin
Glycopeptides	1956	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin
Quinolones	1962	Synthétique	Nalidixic acid
Rifamycines	1967	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Rifampicin
Sous-classe			
Ketolides	2007	Semi-synthétique	Telithromycin
Oxazolidinones	2000	Synthétique	Linezolid
Lipopeptides	2003	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomycin

¹(Butler et Buss 2006; Coates et al. 2011), ²(Shah 2008)

Suite à cette période faste dans le développement d'antibiotiques, l'arsenal disponible semblait suffire pour traiter la majorité des infections problématiques pour la santé humaine. C'était cependant sans compter sur les capacités inégalées d'adaptation des bactéries. En effet, elles peuvent devenir résistantes aux traitements antibactériens qui se traduit par une croissance bactérienne malgré la présence d'antibiotiques à des concentrations plus élevées que celles utilisées dans un cadre thérapeutique. L'apparition de ces résistances est un phénomène naturel qui résulte généralement d'une évolution par sélection naturelle. Lors du traitement d'une infection, les bactéries sensibles sont éliminées alors que celles ayant développé une résistance survivent et se reproduisent en transmettant cette nouvelle faculté. Pour plusieurs bactéries pathogènes, la proportion des infections associées à des souches résistantes a augmenté de plus en plus rapidement au cours des dernières années. Le cas du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) permet de bien illustrer cette situation. De 1995 à 1999, la proportion des infections au *S. aureus* qui était causée par des SARM est passée de 1 % à 6 % au Canada (Conly 2002). Entre 2007 et 2009, il a été évalué que cette proportion avait atteint près de 25 % (Nichol et al. 2011). Aux États-

Unis, la situation est encore plus alarmante puisque près de 50 % des cas d'infection au *S. aureus* sont des cas de SARM (Gootz 2010). Les SARM sont d'ailleurs les organismes résistants aux antimicrobiens les plus répandus au Canada ainsi que dans plusieurs régions du monde (Grundmann et al. 2006). Récemment, des souches bactériennes pathogènes résistantes à plus d'une classe d'antibiotiques (multi-résistantes) ont aussi fait leur apparition. Au moins 7 types de bactéries résistantes ou multirésistantes causent des situations problématiques dans les hôpitaux du Canada (tableau 2). La rapidité de l'augmentation de la fréquence des infections résistantes a été corrélée à une mauvaise utilisation d'antibactériens chez l'homme suite à des diagnostics incorrects ou à cause de consommations inappropriées (Goossens et al. 2005). L'usage excessif comme promoteur de croissance chez les animaux d'élevage est aussi suspecté comme un facteur de risque important pour la propagation des gènes de résistance (Bush et al. 2011).

Tableau 2: Organismes résistants aux antibiotiques identifiés chez des patients d'hôpitaux canadiens en 2008¹

<i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)
<i>Enterococcus</i> résistants à la vancomycine
Bacilles Gram-négatives à β -lactamases de spectre étendu
Les espèces de <i>Klebsiella</i> et autres Enterobacteriaceae résistants aux carbapénèmes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant (incluant des souches résistantes aux quinolones et carbapénèmes)
<i>Acinetobacter baumannii</i> multirésistant
<i>Clostridium difficile</i>

¹(Mulvey et Simor 2009)

Concrètement, l'apparition de plus en plus fréquente de résistances aux traitements antibactériens a plusieurs impacts négatifs. Puisque le traitement antibactérien habituellement recommandé est inefficace, un antibiotique alternatif (de seconde ligne) doit être utilisé. Généralement, ces derniers sont plus dispendieux et accompagnés d'effets secondaires plus importants. De plus, les complications associées aux traitements augmentent les durées d'hospitalisation. Conséquemment, les coûts associés aux traitements des infections résistantes sont plus élevés que pour les infections sensibles causant ainsi un poids supplémentaire sur les systèmes de santé (Mauldin et al. 2010; Bush et al. 2011). En milieu hospitalier, la présence de résistances lors d'infections nosocomiales a été associée à une hausse du taux de mortalité

pour ces infections (de Kraker et al. 2011). Cette hausse signifie aussi un plus grand risque pour la vie des patients nécessitant des procédures dont les risques d'infections sont élevés comme les chirurgies majeures, les transplantations d'organes ou les traitements immunosuppresseurs (Carlet et al. 2012). Dans le cas d'infections par des souches multi-résistantes, les antibiotiques de dernier recours comme les carbapénèmes doivent être utilisés ce qui ouvre la porte à l'apparition de souches encore plus problématiques. La menace la plus inquiétante de l'augmentation rapide des résistances aux antibiotiques est l'apparition d'épidémies dues à des infections bactériennes qui ne pourraient pas être traitées efficacement par l'arsenal actuel d'antibiotiques.

1.3 LE RALENTISSEMENT DE LA MISE EN MARCHÉ DE NOUVELLES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES

Des regroupements d'experts dans le domaine des maladies infectieuses tel que la "Infectious Diseases Society of America" (IDSA) et la "World Alliance against Antibiotic Resistance" (WAAR) ont mis de l'avant différentes actions qui doivent être entreprises pour arriver à contrer l'émergence fulgurante de la résistance aux antibiotiques (Spellberg et al. 2011; Carlet et al. 2012). Parmi celles-ci, une pratique médicale plus adéquate grâce au développement d'outils de diagnostics permettant d'éviter l'utilisation erronée d'antibiotiques est une priorité. Modifier les réglementations concernant l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance pour l'élevage pourrait aussi contribuer à réduire la fréquence d'apparition de résistances. En combinaison avec l'application de ces mesures, le développement de nouvelles classes d'antibiotiques demeurent essentiel (Carlet et al. 2011). Le besoin de nouvelles classes d'antibiotiques est particulièrement criant à cause du ralentissement de la mise en marché d'antibiotiques qui a suivi le succès obtenu jusqu'à la fin des années 1960. En effet, seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques ont été approuvées cours des 50 dernières années, soit les oxazolidinones et les lipopeptides (tableau 1). En 2011, il a été évalué qu'il y avait au moins 27 composés antibactériens en évaluation clinique mais que parmi ceux-ci, seulement deux représentaient de nouvelles classes d'antibiotiques potentielles (Coates et al. 2011). La diminution du développement de nouvelles classes d'antibiotiques s'explique par plusieurs facteurs. Au cours des dernières décennies, la recherche au sein de l'industrie pharmaceutique a surtout été affectée au

développement d'analogues des classes d'antibiotiques connues. Cette stratégie a probablement été priorisée à cause des risques de toxicité moins élevés pour les analogues que pour de nouvelles classes. Plusieurs analogues de β -lactames, de céphalosporines, de quinolones et d'aminoglycosides ont fait leur apparition sur le marché permettant de contrer temporairement certaines résistances associés à ces classes d'antibiotiques. Mais cette stratégie permet surtout "d'acheter" du temps puisqu'il y a une limite au nombre d'analogues qui peut être développé à partir d'un même squelette chimique (Coates et al. 2011). Ultiment, la recherche de nouvelles classes d'antibiotiques doit continuer. Malheureusement, le contexte actuel est défavorable puisque le retour sur l'investissement pour un nouveau composé est limité par les prescriptions qui sont de courtes durées et épisodiques. Les nouvelles classes ne sont prescrites qu'en dernier recours, surtout dans la perspective d'une utilisation adéquate limitant l'apparition de résistances. De plus, les critères réglementaires pour l'approbation d'un nouveau composé ont été resserrés et il est maintenant nécessaire d'effectuer des essais cliniques démontrant clairement une efficacité supérieure par rapport aux antibiotiques déjà sur le marché (US-department of Health and Human Services et al. 2010). Pour sortir de cette impasse, l'organisation mondiale de la santé (OMS) et le Centre Européen de Prévention et Contrôle des Maladies (CEPCM) demandent aux gouvernements d'agir rapidement pour relancer la recherche de nouvelles classes d'antibiotiques (Norrby et al. 2009; Braine 2011).

1.4 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES ISSUS DES PLANTES, UNE SOURCE POTENTIELLE D'ANTIBACTÉRIENS

En plus du contexte économique défavorable, il ne faut pas oublier que la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques représente aussi un défi important en recherche. Les métabolites secondaires issus des microorganismes ont été largement étudiés pour leurs propriétés antibactériennes et il est possible que les antibiotiques "facile à découvrir" grâce à cette stratégie aient déjà été commercialisés (Coates et al. 2011). Il est donc nécessaire d'explorer de nouvelles avenues potentielles pour assurer un développement continu de nouvelles classes d'antibiotiques. En ce sens, l'étude des métabolites secondaires issus des plantes représente une alternative attrayante. En effet, les plantes ont un système de défense complexe

contre les pathogènes qui diffère de celui de microorganismes. Cette défense inclue la production de métabolites secondaires induite par l'intrusion d'envahisseurs microbiens. Ces métabolites sont regroupés sous l'appellation de phytoalexines (Ahuja et al. 2012). Les plantes se servent aussi des phytoanticipines. Ces composés sont stockés et peuvent être libérés au moment d'une infection (Abreu et al. 2012). Parmi les 145 produits naturels antimicrobiens recensés dans la littérature entre 2000 et 2008, 47 sont de la famille des composés phénoliques et la majorité de ceux-ci d'origine végétale (Saleem et al. 2010). Un autre indicateur du potentiel des métabolites secondaires végétaux est la vaste utilisation d'extraits de plantes pour le traitement d'infections en médecine traditionnelle de différentes cultures autour du monde (Navarro et al. 1996; Omar et al. 2000; Bonjar 2004; Koné et al. 2004). Les autochtones d'Amérique du Nord ne font pas exception et utilisaient aussi plusieurs espèces de plantes pour traiter des infections diverses. Une compilation récente des informations disponibles à ce sujet a permis d'identifier 130 différents taxa utilisés pour traiter le rhume, la toux et les maux de gorge et plus de 100 taxa pour les infections de la peau (Uprety et al. 2012). Malgré cela, très peu de plantes de la forêt boréale du Canada ont été étudiées scientifiquement pour leur propriété antibactérienne potentielle. C'est suite à ce constat que le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), au sein duquel j'ai effectué mes travaux de recherche de doctorat, a décidé de s'intéresser aux propriétés antibactériennes des plantes de la forêt boréale du Canada. Depuis plus de 12 ans, le LASEVE s'intéresse à l'identification de métabolites secondaires bioactifs issus des plantes de la forêt boréale. Les travaux effectués ont entre autres permis d'identifier plusieurs composés prometteurs pour le développement d'anticancéreux (Legault et al. 2003; Pichette et al. 2006c; Dufour et al. 2007; Legault et Pichette 2007; Mshvildadze et al. 2007; Simard et al. 2008; Gauthier et al. 2009; Piochon et al. 2009; Pichette et al. 2010). Avec les craintes grandissantes associées à l'émergence rapide des résistances aux antibiotiques et le ralentissement du développement de nouvelles classes d'antibiotiques, il est devenu clair que l'expertise du LASEVE devait être mise à profit pour tenter d'identifier de nouveaux composés antibactériens. Un criblage en continu de plusieurs plantes utilisés par les amérindiens pour traiter diverses infections a donc été amorcé. Des résultats tangibles ont déjà été obtenus

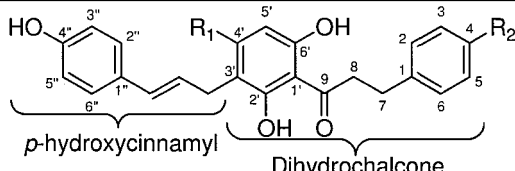
grâce à ces travaux. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de sapin baumier ainsi que de deux sesquiterpènes contenus dans cette huile a pu être démontré (Pichette et al. 2006b). Récemment, les travaux de criblage ont aussi permis de mettre en lumière le grand potentiel d'une autre matrice, les bourgeons de *P. balsamifera*.

1.5 LES BOURGEONS DE *POPULUS BALSAMIFERA*, UNE MATRICE D'INTÉRÊT DANS LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS

Le peuplier baumier (*Populus balsamifera* L.) s'est retrouvé au haut de la liste des espèces d'intérêt dans le cadre des études de criblage antibactérien effectuées au LASEVE. En effet, les bourgeons de cette espèce de peuplier étaient particulièrement prisés des guérisseurs autochtones d'Amérique du Nord. Une revue récente des utilisations traditionnelles des plantes médicinales de la forêt boréale du Canada inclut *P. balsamifera* parmi les plantes qui étaient les plus communément utilisées (Uprety et al. 2012). Moerman, lors de ses imposants travaux concernant l'ethnobotanique des autochtones d'Amérique, l'a aussi incluse dans sa liste des dix espèces ayant le plus grand nombre d'utilisations traditionnelles (Moermann 1998). L'emploi des bourgeons pour obtenir des préparations utilisées sur les blessures, les coupures, les plaies, les engelures et les piqûres d'insectes (Moermann 1998; Marles et al. 1999; Uprety et al. 2012) suggère que cette matrice pourrait posséder des propriétés antibactériennes. Les bourgeons de peuplier sont recouverts d'un exsudat qui possède aussi un intérêt particulier dans le cadre de cette étude de criblage. En effet, la composition chimique des exsudats de bourgeons de peupliers possède une grande similarité avec celle de certains types de propolis (Salatino et al. 2011). Le propolis est un sous-produit des abeilles qui contient des résines issues de plusieurs plantes. Son utilisation en médecine traditionnelle remonte à l'Antiquité et est encore aujourd'hui très répandue dans plusieurs cultures à travers le monde. Le traitement de blessures, de brûlures, de maux de gorge et d'ulcères d'estomac font partie des nombreuses utilisations traditionnelles du propolis. Les propriétés antibactériennes du propolis ont été largement étudiées (Fokt et al. 2010) et la présence de métabolites secondaires issus des exsudats de bourgeons de peupliers ne serait pas étrangère à cette activité dans certains cas (Vardar-Ünlü et al. 2008). Pour toutes ces raisons, les bourgeons de *P.*

balsamifera représentent un excellent candidat pour la découverte de nouveaux composés antibactériens. Un extrait a donc été préparé avec un mélange d'éthanol et d'eau puis l'activité antibactérienne de cet extrait a été évaluée lors des études de criblage du LASEVE. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet extrait contre *S. aureus* a été évaluée à 12.5 µg/ml. Ce résultat était fort encourageant puisque certains auteurs considèrent une activité antibactérienne très intéressante lorsque que la CMI est inférieure à 100 µg/ml pour un extrait de plante et inférieure 10 µg/ml pour un composé isolé (Ríos et Recio 2005). Un projet de maîtrise a donc été entrepris avec comme objectif d'identifier les composés responsables de cette activité. L'extrait de bourgeons a été soumis à un fractionnement guidé par l'activité antibactérienne. Ce fractionnement a été effectué d'abord par extractions liquide-liquide puis par chromatographie sur colonne. Les composés majoritaires de la fraction ayant montré l'activité la plus marquée ont ensuite été isolés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) à l'échelle préparative. Grâce à ces travaux, trois dérivés de dihydrochalcones possédant une activité antibactérienne significative *in vitro* ont été identifiés (basacones A (1), B (2) et C (3), tableau 3). Ces travaux exploratoires ont aussi relevé que la fraction active était riche en d'autres composés phénoliques apparentés et que des travaux plus approfondis étaient nécessaires pour compléter l'identification des composés impliqués dans l'activité antibactérienne des bourgeons. Le potentiel de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* pour l'identification de nouveaux composés antibactériens étaient dès lors bien établi. Le projet de recherche présenté dans cette thèse est la suite logique de ces travaux et vise à compléter l'isolement des composés impliqués dans cette activité.

Tableau 3: Activités antibactériennes des balsacones A, B et C

#	CMI (μM) <i>S. aureus</i> ¹	CI ₅₀ (μM) WS1	
1	6,3	25 ± 2	p-hydroxycinnamyl Dihydrochalcone Balsacone A (1) R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH Balsacone B (2) R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₃ Balsacone C (3) R ₁ = OH, R ₂ = H
2	6,3	> 200	
3	3,1	23,6 ± 0,8	

¹*S. aureus* wild type strain.

1.6 OBJECTIFS ET PLAN DE LA THÈSE

L'hypothèse de départ pour l'élaboration de ce projet de recherche est que l'activité antibactérienne *in vitro* de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* est due à la présence de métabolites secondaires possédant eux-mêmes une activité antibactérienne. Comme mentionné dans la section précédente, cette hypothèse a été vérifiée en partie lors de travaux antérieurs par l'identification des balsacones A (1), B (2) et C (3). Ces résultats ont aussi permis de conclure que ces composés n'étaient pas les seuls responsables de l'activité antibactérienne. La présence d'autres composés apparentés a été détectée dans la fraction active sans qu'ils ne puissent y être identifiés. De plus, les balsacones A, B et C doivent être isolés à nouveau en plus grande quantité pour confirmer la caractérisation de leurs structures et pour procéder à l'évaluation de leur activité antibactérienne sur d'autres souches. Cette étape permettra ainsi de consolider les résultats obtenus pour procéder à leur publication et au dépôt d'une demande de brevet. L'objectif principal du projet de recherche est donc le suivant:

- isoler et identifier les composés impliqués dans l'activité antibactérienne des bourgeons de *P. balsamifera*.

Pour atteindre cet objectif principal, les objectifs secondaires suivants ont été fixés:

- développer une méthode de fractionnement de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* en utilisant l'activité antibactérienne comme guide afin d'étudier l'ensemble des fractions montrant une activité;

- développer une méthode d'isolement efficace des balsacones A, B et C;
- isoler les composés présents dans les fractions les plus actives obtenues par la méthode de fractionnement développée;
- procéder à la caractérisation complète des composés isolés;
- déterminer l'activité antibactérienne des composés isolés *in vitro* sur plusieurs souches de bactéries incluant *S. aureus* et des souches de SARM.

Le premier chapitre de cette thèse établissait la problématique globale de la résistance aux antibiotiques ainsi que les résultats antérieurs qui sont à l'origine du présent projet de recherche. Le second chapitre s'intéresse à un autre aspect de la problématique ayant donné naissance à ce projet de recherche. L'industrie forestière du Canada fait actuellement face à une crise importante résultant entre autres d'une diminution de la demande pour les produits traditionnels comme le bois d'œuvre et le papier. Cette crise a fait valoir la nécessité de diversifier les produits de transformation de la biomasse forestière au Canada. Le chapitre tente de montrer de quelle façon les résultats obtenus au LASEVE concernant les produits naturels bioactifs pourrait mener au développement de nouveaux bioproduits. Cette revue a été préparée en tant que chapitre pour le livre intitulé "Biorefinery Co-products. Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing", publié par Wiley dans la série "Renewable ressources" (Bergeron et al. 2012). Le chapitre est divisé en deux parties, une première s'intéressant à l'identification de nouveaux produits naturels bioactifs issus d'espèces commerciales de la forêt boréale canadienne et la seconde aux modifications chimiques apportées aux produits naturels pour moduler leur bioactivité. Ce chapitre constitue une contribution importante de l'auteur de cette thèse et fournit du même coup une entrée en matière permettant de mieux comprendre certaines retombées potentielles de ce projet de thèse.

Le troisième chapitre présente la littérature scientifique pertinente au projet de recherche. Le chapitre est divisé en trois sections. La première s'intéresse au genre *Populus* et en particulier à l'espèce *P. balsamifera* en présentant la littérature concernant leurs caractéristiques générales, leurs utilisations

commerciales et traditionnelles, la composition chimique de leurs extraits ainsi que leurs activités biologiques. La deuxième section porte sur le propolis. La littérature concernant la composition chimique et les activités biologiques du propolis est abondante. Il est essentiel d'en présenter un survol puisque l'exsudat qui recouvre les bourgeons des peupliers est reconnu comme une des sources végétales du propolis et que plusieurs similarités ont été établies entre leurs compositions chimiques respectives. Enfin, la troisième section porte sur l'activité antibactérienne des flavanoïdes en lien avec les balsacones A (1), B (2) et C (3) qui ont été isolés lors des travaux préliminaires du présent projet. Cette section met particulièrement en lumière les relations qui ont déjà été établies entre les structures des flavonoïdes et leur activité antibactérienne.

Le chapitre 4 présente un article scientifique publié dans *Tetrahedron Letters* concernant l'isolement, la caractérisation et l'évaluation de l'activité antibactérienne des balsacones A (1), B (2) et C (3). Les résultats obtenus avec ces composés ont aussi mené au dépôt d'une demande de brevet provisoire au United States Patent and Trademark Office pour en protéger leur utilisation en tant qu'antibactériens chez l'humain et chez les animaux (Pichette et al. 2012).

Le chapitre 5 est rédigé sous la forme d'un article scientifique dont la publication a été recommandée par les éditeurs du journal *Phytochemistry* conditionnellement à quelques modifications mineures. Il décrit d'abord l'isolement de 6 nouveaux dérivés de dihydrochalcone, les balsacones D à I, obtenus sous la forme de mélanges racémiques. La purification de ces mélanges sur support chiral ainsi que la détermination de la configuration absolue des énantiomères obtenus grâce à une analyse de diffraction de rayons X et aux calculs théoriques des spectres de dichroïsme circulaire y sont aussi décrites. Enfin, l'activité antibactérienne des composés isolés contre *S. aureus* et leur cytotoxicité sur une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1) y sont présentées.

Le chapitre 6 est rédigé sous la forme d'un article scientifique à soumettre prochainement au journal *Organic Letters*. L'isolement de deux composés inédits dont les structures sont des hybrides entre un

ester d'acide hydroxycinnamique et une dihydrochalcone est présenté (balsacones J et K). La purification sur support chiral des composés qui ont été obtenus sous la forme de mélanges racémiques y est aussi décrite. La détermination de la configuration absolue de ces composés est toujours en cours et n'a pu être terminée à temps pour être incluse dans ce chapitre. L'activité antibactérienne et la cytotoxicité des mélanges racémiques et des énantiomères purifiés sont également présentées.

Le chapitre 7 est rédigé sous la forme d'un article scientifique à soumettre prochainement à *Journal of Natural Products*. Les résultats inclus dans cet article concernent l'isolement, la purification sur support chiral et la caractérisation complète (incluant la configuration absolue) de quatre nouveaux dérivés de dihydrochalcones substitués par deux unités hydroxycinnamyles (balsacones L à O) ainsi que de l'iryrantherin-D.

Le chapitre 8 présente les résultats et discussion ainsi que la partie expérimentale de l'isolement de huit autres nouvelles balsacones (P-W). Il est aussi rédigé selon la forme généralement acceptée dans les journaux scientifiques pour faciliter son intégration dans un article qui sera rédigé après le dépôt de cette thèse. Les balsacones P à W sont des dihydrochalcones substituées par un nombre variant entre 2 à 4 unités hydroxycinnamyles. Leur caractérisation y est présentée en détail ainsi que l'approche de séparation chirale qui a été mise en oeuvre. La détermination de la configuration absolue de ces composés est en cours mais n'a pu être complétée à temps pour le dépôt de cette thèse.

Le chapitre 9 présente des résultats d'activité antibactérienne *in vitro* face à des souches de SARM pour la majorité des composés isolés dans ce projet de recherche. Ces résultats sont suivis d'une discussion portant sur différentes relations apparentes entre la structure des composés et leur activité antibactérienne.

Finalement, le chapitre 10 présente la discussion générale et les principales conclusions tirés des résultats obtenus de ce projet de recherche. Ce chapitre propose aussi quelques perspectives futures

envisageables pour la poursuite du développement des balsacons et de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* en tant que produits antibactériens.

CHAPITRE 2

NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM CANADIAN BOREAL FOREST

François Simard, André Pichette and Jean Legault

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des Sciences

Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada

(Chapitre de livre publié dans: Bergeron, C., Carrier, D. J., Ramaswamy, S. (2012). *Biorefinery Co-Products, Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, Wiley.)

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

L'auteur principal de ce chapitre de livre (F. Simard) a rédigé les différentes sections du manuscrit d'après les recommandations de J. Legault et A. Pichette. F. Simard a aussi effectué la recherche de la littérature en lien avec les travaux du LASEVE qui ont été décrits dans le chapitre.

RÉSUMÉ

Le Canada est un endroit idéal pour l'implantation de bioraffineries puisque le pays est déjà un important fournisseur mondial de biomasse forestière. L'implantation des bioraffineries utilisant la biomasse forestière comme matière première est actuellement limitée par leurs faibles rentabilités et ce, surtout en raison du coût élevé associé à la transformation de la biomasse lignocellulosique. L'introduction de co-produits à haute valeur ajoutée comme les produits naturels bioactifs représente une excellente opportunité d'augmenter la rentabilité de telles bioraffineries. Dans ce chapitre, une revue des travaux de recherche du LASEVE au cours des dix dernières années portant sur le développement de nouveaux produits naturels bioactifs est présentée. La revue débute par la description de diarylheptanoïdes issus de *Betula papyrifera*, de diterpènes de type labdane issus de *Larix laricina* et de dérivés d'acides hydroxycinnamiques issus de *Populus tremuloides* qui possèdent tous des activités anticancéreuses *in vitro*. La section suivante est consacrée à certains sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle des aiguilles d'*Abies balsamea* dont l'effet potentialisateur d'un anticancéreux utilisé en clinique a été démontré *in vivo*. Les résultats concernant l'activité antibactérienne de cette huile essentielle et des volatiles qui la composent sont aussi discutés. Enfin, la dernière partie de cette revue s'intéresse à la synthèse de glycosides de triterpènes de type lupane issus de l'écorce externe de *Betula papyrifera* et des effets de ces transformations chimiques sur l'activité anticancéreuse des triterpènes.

INTRODUCTION

From an economical point of view, the Canadian forest represents one of the most important natural resources of this country. In fact, the forest sector is one of Canada's largest employers, providing about 340 000 jobs (Smith et Parkins 2011) mainly in rural communities and all across the country. Since 2002, the Canadian forest sector has been experiencing a great deal of difficulty maintaining its profitability. These problems can mostly be explained by the countervailing duties imposed by the United States on the Canadian softwood industry, but also by the reduction of the cutting rights and the growing competition in world markets (Lapointe et al. 2006; Forest Products Association of Canada 2011; Smith et Parkins 2011). This situation has led to the closure of several wood processing plants and job losses in the last few years. To overcome these difficulties, the forest sector has been forced to review its resource exploitation. In an effort to diversify the production of this sector, the Forest Product Association of Canada (FPAC) has identified different bio products (biofuels, biomaterials and biochemicals) that can be produced from wood fiber and that might strengthen this industry and boost employment in the future (Forest Products Association of Canada 2011). Producing biofuel and biochemicals from forest biomass would also help decrease Canada's dependence on fossil fuels, together with decreasing greenhouse gas production. The FPAC have proposed to integrate the production of these bioproducts at existing wood processing plants (Chambost et al. 2008; Hämäläinen et al. 2011) by modifying them into better-tailored biorefineries. Being an important supplier of forest biomass (Mabee et al. 2005) and possessing important infrastructures, Canada is in an ideal situation for the development of forest based biorefineries (Mabee et al. 2005).

A biorefinery is similar to a petroleum refinery; the major difference is that biomass is used instead of fossil fuels as a feedstock for biofuels, biochemicals and biomaterials production. Forest-based biorefineries must be able to process different biomass feedstocks such as logging and pulping residues. The forest biomass is mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin that complicate its conversion into bioproducts. In fact, cellulose and hemicellulose conversion into free sugars used in the production of most biofuels and biochemicals is still a process in development. Moreover, cheaper solutions already exist for

biofuel such as ethanol production from corn (Fernando et al. 2006; Amidon et al. 2008; Zhang 2008). Biofuels and biochemicals are very attractive products. Unfortunately, the high cost of lignocellulosic biomass processing, combined with relatively low fossil fuels costs, makes their production from forest biomass still unprofitable. To increase profitability, it has been proposed to include the production of high-value/low-volume co-products into biorefineries (Fernando et al. 2006). The development of such high-value co-products from forest biomass is therefore essential for the implantation of forest-based biorefineries in Canada.

Bioactive natural products represent potentially one of the most interesting high-value co-products and their extraction could become the initial processing step for future forest-based biorefineries (H. Clark et al. 2009). Natural products are compounds biosynthesized from the metabolism of living organism. These products can be readily extracted with organic solvents or water under room temperature and atmospheric conditions (Amidon et al. 2008). Therefore, natural products are often referred to as "extractables" or "extractable bioproducts". In plant organisms, many natural products are known to play a protective role against pathogens, other plants, animals and UV radiation (Bourgaud et al. 2001). For several centuries, Native people have been taking advantage of these defensive properties by using plants as medicines (Saklani et Kutty 2008). In fact, natural products are known to possess a wide range of beneficial effect on human health (Raskin et al. 2002) and the discovery of many modern drugs results from the identification of bioactive natural products (Harvey 2008). Thanks to these discoveries, many bioactive natural products or plant extracts have become feedstock for the pharmaceutical industry (Fowler 2006; Wetzel et al. 2006c). One of the most well-known and commercially successful natural product is paclitaxel. Paclitaxel was first isolated in 1969 by the US National Cancer Institute (NCI) from the bark of *Taxus brevifolia* (Guenard et al. 1993), a coniferous tree growing on the pacific coast of North America (Burns et Honkala 1990). It was found to inhibit cancer cell division thanks to a unique mechanism involving the cell's microtubules (Guenard et al. 1993). Taxol[®], the commercial drug containing paclitaxel, became one of the most popular anticancer

drug worldwide, with sales reaching \$1,5 billion in 1999, and today's total market remains over \$1 billion per year (Malik et al. 2011). During the development of paclitaxel as a commercial drug, its availability rapidly became a problem. Wild harvested *T. brevifolia* biomass was not sufficient to provide the quantities needed. To overcome this hurdle, a semisynthesis of paclitaxel using baccatin III as a starting point has been developed (Baloglu et Kingston 1999). Baccatin III can be isolated in significant yield from the foliage of *Taxus baccata*, a European species. In Canada, few companies (Chatam Biotec Ltd., Biolyse Pharma and Active Botanicals Co. Ltd.) are producing paclitaxel from *Taxus canadensis* (Bourgault et al. 2008), a slow-growth shrub found throughout the Atlantic and Quebec provinces of Canada (Wetzel et al. 2006c). The paclitaxel example illustrates the great potential of a bioactive natural product to evolve into a high-value pharmaceutical bioproduct. However, the commercial use of bioactive natural products is not limited to the pharmaceutical industry. Plant extracts and isolated natural products are also used in manufacturing of cosmeceuticals (Thornfeldt 2005; Baumann 2007; Arct et Pytkowska 2008; Davis et Perez 2009; Epstein 2009) and nutraceuticals (Wetzel et al. 2006a; Espín et al. 2007). There are also potential markets to be developed, such as plant extractables that can be used as pesticides (Copping et Duke 2007; Dayan et al. 2009), antiparasitic agents for animal husbandry (Naidoo et al. 2008; Zahir et al. 2009; Zahir et al. 2010) and food preservatives (Tripathi et Dubey 2004; Balasundram et al. 2006). Most of these uses require relatively small volumes of bioactive natural products, but would yield a larger income than biofuels or commodity chemicals extracted from the biomass. Consequently, bioactive natural products represent an excellent opportunity to facilitate the implantation of forest-based biorefineries in Canada.

Canada's First Nations have acquired a rich knowledge of how to use boreal forest plant species as food, medicine or materials (Black 1980; Moermann 1998; Marles et al. 1999). These ethno-pharmacological skills clearly highlight the potential of developing new bioactive natural products from the boreal forest of Canada. However, these skills remain largely empirical and, combined with the fact that scientific studies examining their traditional uses are scarce; the development of high-value co-products derived from a

biorefinery setting is somewhat limited. Over the last ten years, our research group has undertaken the task of gathering information about the chemical composition and the bioactivity of plant species from the Canadian boreal forest. The work was focused on the identification of new bioactive natural products and the development of these natural products into bioproducts. In this chapter, the work carried out in our laboratory will be presented into two main reviews: (i) bioactive compounds isolated from widespread and commercial tree species currently used by the forest industry sector. These species, namely *Betula papyrifera*, *Larix laricina*, *Populus tremuloides* and *Abies balsamea* are potential feedstock for the future Canadian forest-based biorefineries and their bioactive extractables are potential high-value co-products. (ii) synthesis of derivatives from bioactive natural products which is an attractive step in the development of bioactive natural products into biopharmaceuticals.

IDENTIFICATION OF NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM CANADIAN BOREAL FOREST

Selection of plant species and bioguided isolation process

The first step to discovering new bioactive compounds from the Canadian boreal forest consists in the selection of species suspected of containing bioactive natural products. In addition to chemotaxonomic knowledge (data available on closely related species), ethno-pharmacological knowledge is a rich source of information for plant species screening. Reports on the folk medicine developed by the First Nations from the North American boreal forest territory are available (Black 1980; Arnason et al. 1981; Ritch-Krc et al. 1996; Moermann 1998; Marles et al. 1999; Black et al. 2008) and are remarkable tools for plants selection for screening of their different bioactivities. The next step is the evaluation of the extracts from the selected plant species for bioactivity. Plant extracts are complex mixtures of highly diversified compounds which generally are not good candidates for modern high-throughput screening assays (Koehn et Carter 2005). For example, tannins complexes with numerous proteins can lead to false positive in purified proteins bioassays (Potterat et Hamburger 2008). Development of bioassays applicable to plant extract is therefore critical to assess bioactivity. It must be pointed out that in our research group *in vitro* cell-based bioassays have been

efficient for the discovery of new antibacterial (Pichette et al. 2006b) and cytotoxic compounds (Legault et al. 2003; Pichette et al. 2006a; Dufour et al. 2007; Mshvildadze et al. 2007; Simard et al. 2008; Pichette et al. 2010).

Once the bioassay is well established, bioguided isolation is a straightforward and very efficient strategy for the identification of the compounds responsible for the plant extract bioactivity (Pieters et Vlietinck 2005). During this process, the plant extract is roughly fractionated in a limited number of fractions using simple and cheap separation methods, such as liquid-liquid extraction or column chromatography. The obtained fractions are assayed using the biological target, to identify the fraction that maintains the bioactivity detected earlier in the extract. Depending on the complexity of the active fraction, a second fractionation can be performed before isolation. The later is carried out using fine chromatographic techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) or high speed counter-current chromatography (HSCCC). Finally, isolated compound structures are characterized using spectroscopic methods (IR, NMR and MS spectroscopy) and their bioactivity is assayed. Recent progress in the analytical tools available for the analysis of plant extracts, as well as chromatographic fractions, has facilitated the identification of ubiquitous and known compounds early in the fractionation process, thus significantly accelerating the bioguided isolation process. This progress is reviewed elsewhere (Koehn 2008; Lang et al. 2008). In this section, a review will be presented concerning the screening work that has been done over the last 10 years in our research group on Canadian boreal forest commercial species to discover new bioactive natural products.

Diarylheptanoids from the inner bark *Betula papyrifera*

Betula papyrifera Marsh. is widely distributed all across Canada following the northern limit of tree growth from Newfoundland to British Columbia (Burns et Honkala 1990). Over the years this plant has gained huge industrial importance in Canada, mainly for the production of paper pulp. This production yields large quantities of waste bark which is currently used as a cheap fuel at paper mills to save energy

(Krasutsky 2006). An attractive avenue to add value to this waste is its use as a component of growing media (Naasz et al. 2009) or for particle board production (Pedieu et al. 2009). Combined with these new applications, the extraction of bioactive natural products as a high-value co-product could significantly enhance the profitability of paper mills, making them efficient biorefineries. *B. papyrifera* bark is divided into inner bark and outer bark. Lupane triterpene extractibles from the outer bark have been extensively studied for their use in cancer and HIV treatments. Recent developments in the chemistry and the bioactivity of these extractibles have been reviewed (Krasutsky 2006). On the other hand, hardly any scientific information is available on the chemical composition and the bioactivity of the extractibles from *B. papyrifera* inner bark. Studies on the inner bark of other species of the *Betula* genus revealed that the main extractibles are phenolics, mainly arylbutanoids, diarylheptanoids, lignans and phenolic glycoside (Smite et al. 1993; Pan et Lundgren 1994; Smite et al. 1995; Santamour et Lundgren 1996; Santamour et Lundgren 1997). This information combined with the fact that inner bark biomass is more abundant than the outer bark prompted us to investigate inner bark extractibles of *B. papyrifera* to identify new bioactive natural products.

The investigation was performed as follow: the inner bark was first extracted using a hydro-alcoholic mixture and the concentrated aqueous residue was submitted to liquid-liquid extraction using ethyl acetate (EtOAc). The dried EtOAc phase was assayed by a multi-well *in vitro* cell culture method using human lung carcinoma (A549), human colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and human normal skin fibroblast (WS1). The EtOAc phase was found to exert significant cytotoxic activity against A549 and DLD-1 so bioguided fractionation was initiated. The fractionation steps were executed first by using an open Diaion® column, followed by silica gel column chromatography. From the second fractionation step, three fractions exhibited interesting *in vitro* cytotoxic activities against the cancer cell lines. These fractions were purified using silica gel column chromatography, polyamide flash column chromatography and preparative HPLC to afford 10 phenolic compounds of the following types: diarylheptanoid glycosides (4-7), a

diarylheptanoid (**8**), a lignan (**9**), flavonoids (**10-11**) and chavicol glycosides (**12-13**) (Mshvildadze et al. 2007), see Fig. 1. Amongst them, papyriferoside A (**4**) had never been isolated before, while the other nine products (**5-13**) had never been reported from *B. papyrifera*. The *In vitro* cytotoxic activities of all the isolated compounds were assessed and platyphylloside (**7**) exhibited the strongest cytotoxicity with IC₅₀ values of 13.8 ± 0.5 and 12.6 ± 0.3 μM against A549 and DLD-1 cells, respectively. The new compound papyriferoside A (**4**) also showed significant cytotoxicity with IC₅₀ values of 30 ± 2 and 20.8 ± 0.8 μM against A549 and DLD-1 cells, respectively.

Several studies have demonstrated the cytotoxic properties of diarylheptanoids (Wohlmuth et al. ; Ali et al. 2001; Choi et al. 2008; Tian et al. 2009) such as curcumin (**14**), a well-known diarylheptanoid from the indian spice turmeric (*Curcuma longa*). Curcumin (**14**) has been extensively studied for its use in the treatment of different cancers (Bar-Sela et al.) and other inflammatory-related diseases (Aggarwal et Harikumar 2009), and has now reached clinical II trials (Dhillon et al. 2008). These results suggest that diarylheptanoids from *B. papyrifera* inner bark might be good candidates for evaluation for cancer chemotherapy. Since platyphylloside (**7**) can be isolated from *B. papyrifera* inner bark with a good yield (Mshvildadze et al. 2007), it could also represent an excellent starting point for the semi-synthesis of new anticancer diarylheptanoid derivatives. For all these reasons, birch waste bark is a promising source of anticancer diarylheptanoids for development as pharmaceutical bioproducts.

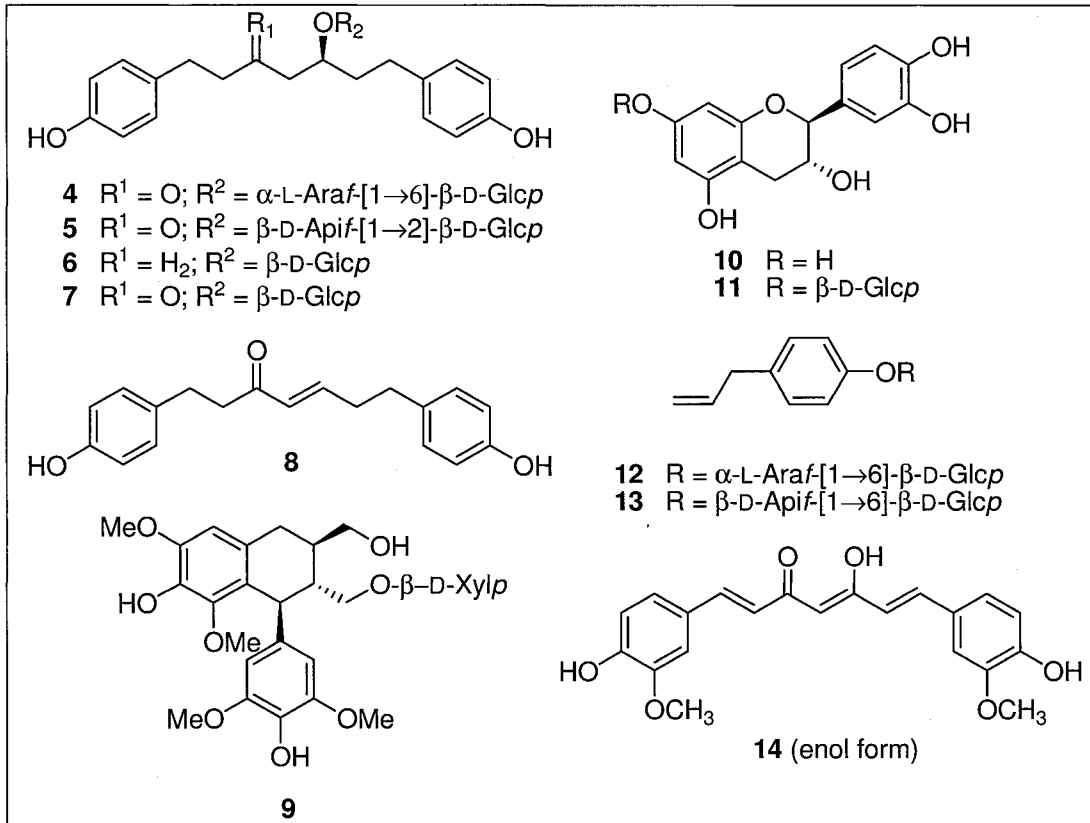


Figure 1: Phenolic compounds from *B. papyrifera* inner bark and curcumin.

Labdane diterpenes from *Larix laricina*

Larix laricina is another industrially important tree species widely used for paper production (Burns et Honkala 1990). Since the bark from *L. laricina* had never been evaluated for its cytotoxicity before, the potential of this biomass was assessed in our laboratory for anticancer agents. A bark extract obtained with CHCl_3 as the extraction solvent showed significant *in vitro* cytotoxic activity against two human cancer cell lines (A549 and DLD-1) (Pichette et al. 2006c). Fractionation of this extract using silica gel column chromatography, followed by preparative HPLC purification of active fractions led to the isolation of two new labdane diterpenes (**15** and **16**), a known labdane diterpene (**17**) and rhapontigenin (**18**). The labdane diterpenes **16** and **17** showed moderate cytotoxicity against the two cancer cell lines (A549 and DLD-1) but also against the normal skin fibroblast cell line WS1 with IC_{50} values ranging from 32 to 69 μM . Compound **15** showed an interesting selectivity by being cytotoxic to the DLD-1 cancer cell line ($\text{IC}_{50} = 37 \pm 3 \mu\text{M}$), while

being inactive against the A549 cancer cell line and the WS1 normal cell line ($IC_{50} > 200 \mu M$) (Pichette et al. 2006c). Recently, structurally related labdane diterpenes **19** and **20** isolated from the *Pinus massoniana* resin showed strong cytotoxicity, with IC_{50} values ranging from 0.38 to 19.62 μM against A431 and A549 cancer cell lines (Yang et al. 2010). Sclareol (**21**), another related labdane diterpene has been studied for its effect on human leukemia and breast cancer cells (Dimas et al. 2006) growth, as well as its ability to decrease *in vivo* tumour cell growth rate (Noori et al. 2010). These results show the potential of labdane diterpenes for their use in cancer chemotherapy. The high yield obtained in our studies for the isolation of the labdane diterpene **15** from *L. laricina* bark (Pichette et al. 2006c) could contribute to make this widespread species a good raw material for the production of bioactive labdane diterpenes from biomass.

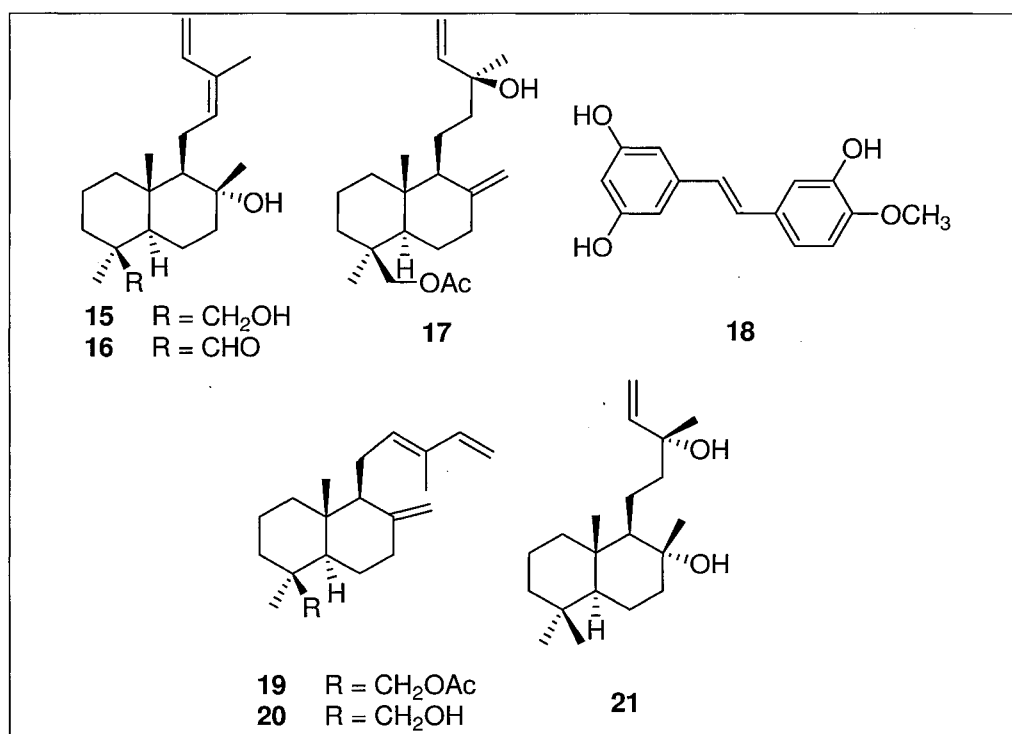


Figure 2: Compounds isolated from *L. laricina* bark and other bioactive labdane diterpenes.

Phenolic compounds from *Populus tremuloides* buds

Poplar trees are well known for their phenolic compounds content which includes flavonoids (Komoda 1989; Kurkin et al. 1990), hydroxycinnamic acid derivatives (Greenaway et al. 1988; Greenaway et

al. 1991; Isidorov 2003) and phenolic glycosides (Ogawa et al. 2006; Zhang et al. 2006b). Interest in the chemical composition of the extractibles from the genus *Populus* is, in part, due to thousands of years old historical use of the resinous hive product Propolis. In fact, propolis from North America, Asia and Europe is produced from exudate collected by honeybees from poplar trees buds (Banskota et al. 2001). Propolis is known to possess a broad spectrum of biological activities which include antitumor and antimicrobial activities (Banskota et al. 2001; Ghedira et al. 2009). Its chemical composition is determined by the tree species from which the bees collected the exudate (Vardar-Ünlü et al. 2008). It has been demonstrated that one of the main source of exudate from the boreal region of Canada is *P. tremuloïdes* (Christov et al. 2005). Since *P. tremuloïdes* is also one of the most widespread trees in North America (Burns et Honkala 1990), a bud extract was included in our screening work to identify new bioactive natural products.

Buds were extracted using an EtOH-H₂O mixture and the aqueous concentrated residue was submitted to liquid-liquid extraction using hexane and H₂O saturated n-butanol. The n-Butanol phase was dried and submitted to an open Diaion® column followed by further fractionation using an open silica gel column. Fractions were investigated for their *in vitro* cytotoxic activity (against A549, DLD-1 and WS1 cell lines) and antibacterial activity (against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). One fraction exhibited weak cytotoxicity against the three cell lines and was purified using semi preparative HPLC to afford 10 phenolic compounds (Pichette et al. 2010). Amongst these, the two related hydroxycinnamic acids **22** and **23** were moderately cytotoxic (IC₅₀ values ranging from 19 to 51 µM) against the cancer cell lines used. An earlier report showed that hydroxycinnamic acid **23** along with 20 other synthetic derivatives were strongly cytotoxic against the highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line (Nagaoka et al. 2002). Additionally, other simple hydroxycinnamic acid derivatives such as artemillin C (**24**), Baccharin (**25**) and drupanin (**26**) have been shown to induce apoptosis against SW480 and HL60 cancer cell lines (Akao et al. 2003). Overall, these results suggest that hydroxycinnamic acid derivatives are potential bioproducts for cancer treatment.

The new hydroxycinnamic acid derivative obtained from this work, compound **27**, did not exhibit good abilities for cancer chemotherapy. However, it will be interesting to evaluate its potential as a dietary supplement. In fact, quinic acid ester and glucose ester of hydroxycinnamic acid structurally related to compound **27** are well known dietary phenolic compounds found in many fruits and vegetables (Winter et Herrmann 1986). Moreover, chlorogenic acid (**28**), the most common ester of hydroxycinnamic acid possesses antioxidant properties (Tsychiya et al. 1996; Lafay et al. 2006) that have been correlated with the prevention of different cancers (Banskota et al. 2001; Zhang et al. 2006b; Ghedira et al. 2009) as well as cardiovascular diseases (Suzuki et al. 2002; Lafay et al. 2006). Evaluation of the antioxidant activity of compound **27** is currently progressing in our laboratory to assess its potential as a dietary supplement from the buds of *P. tremuloides*.

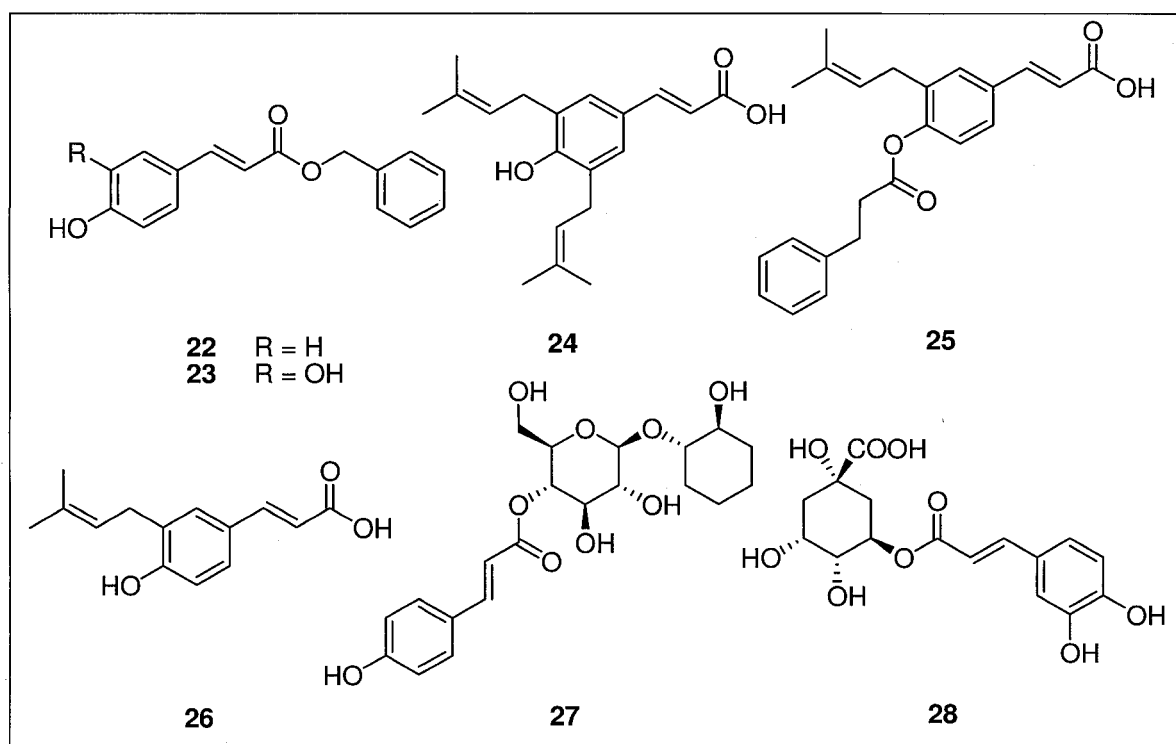


Figure 3: Hydroxycinnamic acid derivatives from *Populus* spp and propolis.

Sesquiterpenes from *Abies balsamea*

Essential oils are already well established bioproducts used in perfumes and make-up products, in sanitary products, in dentistry, in agriculture, as food preservatives and additives, as well as natural remedies (Bakkali et al. 2008). Most of these applications are based on bactericidal, virucidal and fungicidal properties, as well as on essential oil fragrances (Bakkali et al. 2008). *A. balsamea* foliage produces an important essential oil (Berger et al. 2007) mainly employed in the perfumery industry, but little is known about its biological properties. Since the chemical composition of this essential oil is well known (Winter et Herrmann 1986; Akao et al. 2003; Balasundram et al. 2006) our investigations were focused on cytotoxicity and antibacterial activities of both the oil and its components (Moermann 1998; Balasundram et al. 2006) to characterize useful bioactive compounds.

Using several solid tumor cell lines, including MCF-7, A549, DLD-1, M4BEU and CT-26 *A. balsamea* essential oil showed significant cytotoxic activity with GI_{50} values ranging from 0.76 mg/ml to 1.7 mg/ml. GC-MS analysis revealed that this product was constituted of about 96 % monoterpenes along with some sesquiterpenes already described in the literature (von Rudolph et Grant 1982; Simard et al. 1988). From the 17 compounds identified in this analysis, only the sesquiterpene, α -humulene (**29**) was found to be cytotoxic against human breast adenocarcinoma cells MCF-7 with GI_{50} value of $73 \pm 2 \mu\text{M}$. α -Humulene (**29**) was also tested on the other solid tumor cell lines (A549, DLD-1, M4BEU and CT-26) and was found to be active against all of them, with GI_{50} values ranging from 53 to 73 μM . Further investigations showed that α -humulene (**29**) and *A. balsamea* essential oil induce intracellular glutathione (GSH) depletion and increased ROS production that might be responsible for their cytotoxicity (Legault et al. 2003). Surprisingly, the concentration of α -humulene (**29**) was not adequate to explain the cytotoxicity of *A. balsamea* oil. In fact another compound present in the oil might be acting in synergy with α -humulene (**26**) to promote its cytotoxic activity. β -caryophyllene (**30**) appeared to be a good candidate since it was reported that it promoted 5-fluorouracil absorption across human skin (Cornwell et Barry 1994). Promotion of skin absorption suggests that β -caryophyllene (**30**) could increase intracellular accumulation of anticancer

agents, thereby potentiating their cytotoxicity. Furthermore, β -caryophyllene (**30**) did not show any cytotoxicity at a concentration of 250 μ M against the MCF-7 solid tumour cell line. As it turns out, the use of a combination of 10 μ g/ml of β -caryophyllene (**30**) with 32 μ g/ml of α -humulene (**29**) inhibited the growth of MCF-7 solid tumour cell line by 75 ± 6 % which is significantly more than α -humulene (**26**) alone at the same concentration (50 ± 6 % of inhibition). To corroborate these potential properties, β -caryophyllene (**30**) was also used in combination with paclitaxel (**31**), an antitumor agent clinically used to treat breast, ovarian and lung cancers. β -caryophyllene (**30**) significantly increased the growth inhibition of paclitaxel (**28**) against MCF-7 and L-929 cancer cell lines and the highest potentiating effect was obtained against DLD-1 cancer cell line, with an increase in growth inhibition of about 189%. Thanks to its low toxicity, β -caryophyllene (**30**) is a promising molecule in cancer chemotherapy by allowing reduction of the quantity of paclitaxel (**31**) or other anticancer agent necessary for the treatment, thereby reducing unwanted side effects.

Antibacterial activity is one of the most common biological properties of essential oils (Bakkali et al. 2008). However, no scientific study regarding the antibacterial activity of *A. balsamea* essential oil had been performed. This task was undertaken by our laboratory using one gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and one gram-negative (*Escherichia coli*) bacterial strain. The essential oil was inactive against *E. coli*, while the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined to be 56 μ g/ml against *S. aureus* (Pichette et al. 2010). To identify the compounds responsible for the antibacterial activity, all the compounds identified by GC-MS analysis were assayed against *E. coli* and *S. aureus*. Surprisingly, α -pinene (**32**) was found to be active against both bacterial strains with an MIC value of 13.6 μ g/ml, while the essential oil was inactive against *E. coli*. The antibacterial activity of α -pinene (**32**) against *S. aureus* was already known (Raman et al. 1995). The most active compounds against *S. aureus* were β -caryophyllene (**30**) and α -humulene (**29**), with MIC values of 5.1 and 2.6 μ g/ml, respectively. The antibacterial activity of these two sesquiterpenes (**29** and **30**) had not been evaluated before. The results of this work established the antibacterial properties of essential oil from *A. balsamea* foliage pinpointing its potential industrial application. Additionally, the antibacterial activity of

β -caryophyllene (**30**) and α -humulene (**29**) was demonstrated for the first time. Further work should determine if these sesquiterpenes (**26** and **27**) could be used as promising antibacterial forest bioproducts in cosmetic, food or pharmaceutical applications .

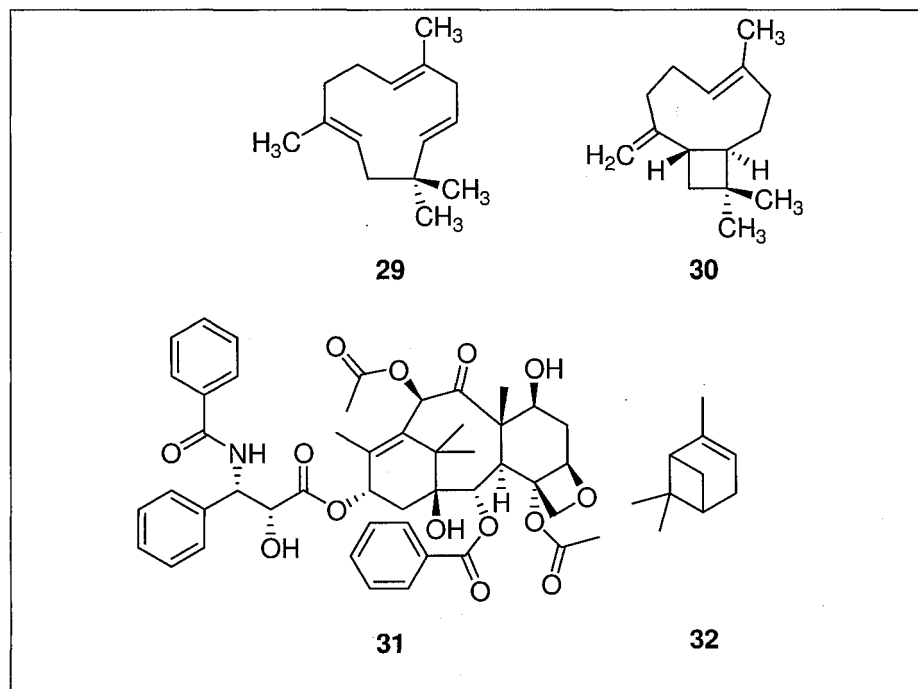


Figure 4: α -humulene (**26**), β -caryophyllene (**27**), paclitaxel (**28**) and α -pinene (**29**).

CHEMICAL MODIFICATION OF BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM THE CANADIAN BOREAL FOREST

Derivatization is an important part of the development of bioactive natural products into viable bioproducts. This is especially true regarding pharmaceuticals, where 23% of the drugs approved between 1981 and 2002 in the United States were derivatives of natural products (Newman et al. 2003; Butler 2005). Chemical or enzymatic synthesis of derivatives from natural products may have different purposes. Availability could be one criterion as many bioactive natural products are obtained in small yield from the biomass. Therefore, the semi-synthesis of a bioactive natural product from a more abundant structurally related compound may provide the targeted quantity for development or commercialization. A good example is the cytotoxic compound betulonic acid (**33**), which can be obtained with a 2.8 % yield or lower from *Betula* spp. outer bark (Krasutsky 2006). To pursue the development of betulonic acid (**33**) as an

anticancer agent, a simple two-steps semi-synthesis has been developed using betulin (**34**) as the starting product (Kim et al. 1997; Pichette et al. 2004). Betulin (**34**) can be isolated at a much higher yield, around 17 %, from the outer bark of *Betula* spp. (Krasutsky 2006). Derivative synthesis may be also related to pharmacokinetic properties (absorption, distribution, metabolism and elimination) (Rautio et al. 2008). For example, if a given bioactive natural product possesses a low water solubility (high partition coefficient), functionalities can be added to the compound to increase its solubility. Finally, derivative synthesis can also be used to determine structure activity relationships (SARs). Defining SARs results in the determination of important functionalities associated with the action mechanism of the bioactive natural product and may lead to improved bioactivity. In the following section, a review on the glycosidation of bioactive natural products from Canadian boreal forest will be covered. This strategy has been developed in our facilities to promote new bioproduct development. Many classes of bioactive natural products such as terpenes, alkaloids, and flavonoids appear as glycosides in plants (Kren et Martinkova 2001). The glycosidic residue can be directly involved in the action mechanism of the bioactive compound or modulate its pharmacokinetic properties (Kren et Martinkova 2001). It is generally accepted that glycosides are more hydrophilic than their aglycon, aqueous solubility being an important factor in pharmacokinetics (Rautio et al. 2008).

Glycosidation of triterpenoids from outer bark of *B. papyrifera*

Lupane triterpenes are readily available in good yield from *B. papyrifera* outer bark. Betulin (**34**), which is the most abundant triterpenoid from the outer bark (Krasutsky 2006), can be used as a starting point for a simple two-step semi-synthesis of betulinic acid (**33**) (Kim et al. 1997; Pichette et al. 2004), which can also be isolated from the bark, but with a much smaller yield. Betulinic acid (**33**) is well known for its *in vitro* cytotoxic activity against a broad panel of human cancer cells (Pisha et al. 1995; Fulda et al. 1997; Fulda et al. 1999), for its *in vivo* tumour growth inhibition (Pisha et al. 1995) and for its non-toxicity in normal cells (Zuco et al. 2002), making betulinic acid a very promising anticancer agent. However, an important limitation to clinical development is its weak water solubility in media such as blood serum and polar solvents used for

bioassays (Cichewicz et Kouzi 2004). In our laboratory, the chosen strategy to increase betulinic acid's hydrosolubility was the synthesis of glycoside derivatives.

To evaluate properly the effect of a sugar moiety addition upon the cytotoxicity of lupane triterpenes; betulin (**34**), betulinic acid (**33**) and lupeol (**35**) were used for glycosidation with D-glucose, L-rhamnose and D-arabinose. The importance of the COOH group at C-28 position for the cytotoxicity of betulinic acid (**30**) has been established elsewhere (Kim et al. 1998), therefore glycosidation was performed selectively at C-3 position. Glycosidation was also performed at C-3 position with lupeol (**35**) which bears only one hydroxyl group, while both C-3 and C-28 glycosides of betulin (**34**) were prepared. The strategy used for glycosidation starts with the preparation of sugars for coupling. Sugar hydroxyl groups were completely protected with benzoyl groups, followed by selective deprotection in anomeric position and by activation at the same position using a trichloroacetimidate group. Betulinic acid and betulin also needed to be selectively protected to avoid the formation of a mixture of C-3 and C-28 glycosides. Betulin was selectively protected by an acetate group at the C-28 position because of the higher reactivity at that site. To obtain acetate in position C-3 of betulin, both hydroxyl groups (C-3 and C-28 positions) were acetylated, followed by a selective deprotection at C-28 position. In the case of betulinic acid, the COOH group at C-28 position was protected using an allyl group which was chosen because of a more efficient regeneration of the acid function after glycosidation. Glycosidation reactions were carried out between the activated sugars and triterpenes having only one free hydroxyl group. Removal of the protecting groups (benzoyl, acetate and allyl) gave 15 different glycosides which were submitted to cytotoxicity bioassays against three cancer cell lines (A549, DLD-1 and B16-F1) and one healthy cell line (WS1) (Gauthier et al. 2006). The addition of a D-glucose moiety to lupeol (**35**), which was weakly cytotoxic against the tested cell lines (IC_{50} values ranging from 63 to 165 μ M), substantially enhanced its cytotoxicity about 7- to 12-fold with IC_{50} values ranging from 14 to 15 μ M. Additions of L-rhamnose and D-arabinose to lupeol led to less improvement in cytotoxicity. As far as betulin (**34**) was concerned, addition of a D-glucose moiety at C-3 provoked a complete loss of

cytotoxicity, while C-3 α -L-rhamnoside and C-3 α -L-arabinoside were weakly cytotoxic (IC_{50} values ranging from 18 to 63 μ M). Glycosidation on the C-28 primary alcohol of betulin (**34**) completely suppressed cytotoxicity. As expected, the higher cytotoxic glycosides obtained in this study were those having betulinic acid as aglycone. The most effective sugar moiety added at the C-3 position of betulinic acid was L-rhamnose (compound **37**) having IC_{50} values against cancer cell lines ranging from 2.6 to 3.9 μ M. Furthermore, C-3 betulinic acid glycosides were the only compounds exhibiting different cytotoxicities toward cancer cell lines in comparison to healthy ones. This selectivity toward cancer cells was increased by up to 12-fold in the case of the C-3 α -L-rhamnoside of betulinic acid (**37**) which is the most potent glycoside obtained in this study. These positive results prompted us to investigate in depth the cytotoxic potential of glycosylated lupane triterpenes by undertaking the preparation of bidesmosides (Gauthier et al. 2008).

Lupane triterpene bidesmosides consist of the lupane-type triterpenoid aglycone bearing two sugar moieties usually at the C-3 and C-28 positions. Although bidesmosides of the lupan-type are scarce in nature, *3 β -O-(α -L-arabinopyranosyl)lup-20(29)-ene-28-O- β -D-glucopyranosyl ester* (**38**) isolated from *Schefflera rotundifolia* has been shown to exhibit noticeable cytotoxicity against J774.A1, HEK-293 and WEHI-164 cell lines. Therefore, our study began with the semi-synthesis of the natural bidesmoside **35** starting from betulinic acid (**33**). To obtain significant information about the SAR of lupane-type bidesmosides, seven other non-natural lupane bidesmosides bearing D-glucose, L-arabinose and L-rhamnose sugar moieties were also prepared starting from betulin (**34**) and betulinic acid (**33**). The syntheses were carried out by a combination of Schmidt's procedure and phase transfer conditions using fully benzoylated trichloroacetimidate and sugar bromide donors (Gauthier et al. 2008). All bidesmosides were assayed against A549, DLD-1, MCF7 and PC-3 human cancer cell lines. This studies showed that the most active bidesmosides were those bearing L-rhamnose sugar moieties. Betulinic acid (**30**) and betulin (**34**) aglycones bearing L-rhamnose moieties at both C-3 and C-28 positions (compounds **39** and **40**) were highly cytotoxic against cancer cell lines with IC_{50} values ranging from 6.0 to 7.2 and 1.7 to 1.9 μ M, respectively. These

results clearly highlighted the beneficial effect of the addition of L-rhamnose moieties that has also been observed in the cytotoxicity of solasodine steroidal glycosides (Chang et al. 1998). It was suggested that certain types of cancer cells may have protein receptors that recognize L-rhamnose moieties and help deliver the anticancer agent directly to the tumour (Gauthier et al. 2008). It is also interesting to note that most betulinic acid bidesmosides showed similar or higher cytotoxicity than betulinic acid (**33**), even though the COOH group at C-28 was not free. As mentioned above, the importance of this COOH group for the betulinic acid cytotoxicity has been demonstrated in the literature (Kim et al. 1998). In summary, our work on the synthesis of glycosides (Gauthier et al. 2006) and bidesmosides (Gauthier et al. 2006) clearly revealed the potentiating effect of adding L-rhamnose moieties to lupane-type triterpenes. Glycoside **37** and bidesmosides **39** and **40** prepared in these two studies showed strong cytotoxicity, making them very attractive as clinical anticancer agents. To further investigate this potential, haemolytic activity evaluation of a library of natural and semi-synthetic glycosides and bidesmosides including compounds **37**, **39** and **40** were performed.

A major drawback for the clinical development of glycosides and bidesmosides as antitumour agents is the toxicity induced in most animals by red blood cell haemolysis. No study on the haemolytic activity of glycosides and bidesmosides having betulin and betulinic acid as aglycones was available. Therefore, this task was undertaken in our laboratory to better evaluate their clinical potential. The results obtained in this study showed that glycosides and bidesmosides of the lupane family possess a much weaker haemolytic activity than most other aglycone families, including the oleanane family (Gauthier et al. 2009). The highly potent glycoside **37** and bidesmoside **40** exhibited no haemolytic activity making them promising anticancer agents for studies of tumour growth inhibition in animals. Work is currently in progress in our laboratory to elucidate the mechanism of action of these two compounds, as well as to evaluate their efficiency on animal models. We do believe that these two compounds represent excellent prospects to become valuable bioproducts. Process development beginning with the extraction of betulin followed by

semi-synthesis of glycosides derivatives **37** and **40** would be an excellent approach to add value to waste bark generated by industrial uses of *B. papyrifera*.

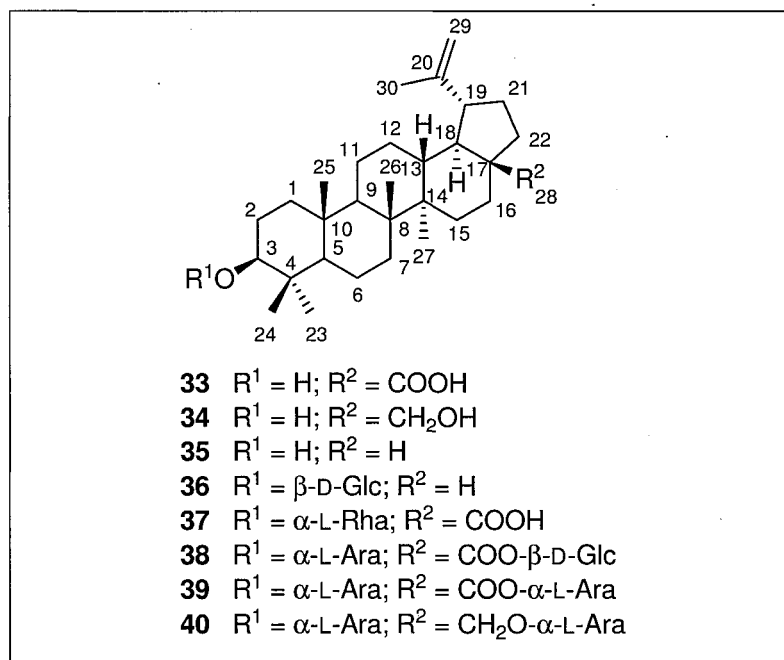


Figure 5: lupane-type triterpenes, saponins and non-natural saponins.

CONCLUSION

In this chapter, studies by our research group over the past 10 years, aiming at demonstrating the potential of natural products to become valuable bioproducts were covered. Over the years, cytotoxic activities on cancer cell lines of diarylheptanoids **4** and **7**, labdane diterpenes **15**, **16** and **17**, hydroxycinnamic acids **23** and **24** and sesquiterpene **29** all isolated from commercial species of Canadian boreal forest were demonstrated. A non-toxic sesquiterpene (**31**) possessing a high potentiating effect on anticancer agents used clinically, such as Paclitaxel, was also identified. Some of these compounds represent very attractive opportunities for the development of biopharmaceutical products used in the treatment of cancer. Our pursuit of new bioactive natural products from commercial species of the Canadian boreal forest biomass also led us to screen for antibacterial activity. Essential oil from the foliage of *A. balsamea*, along with two of its components (sesquiterpenes **29** and **30**) showed significant *in vitro* antibacterial

activity on *S. aureus*, making them potential bioproducts for the cosmetic, food or pharmaceutical industries. Synthesis of derivatives has also been used in our laboratory to modulate the pharmacokinetics of bioactive natural products and ultimately increase their potential to be developed as biopharmaceuticals. Glycosidation of anticancer lupane triterpenoids has allowed us to identify compounds **37**, **39** and **40** as potential clinical anticancer agents. Overall, we do believe that these results clearly show the potential of natural products to become profitable co-products that would facilitate the implantation of forest-based biorefineries in Canada.

While these results represent an excellent starting point to promote the concept of integrating bioactive natural product extraction in biorefineries, there is still some work to be done before biorefineries use this type of process. During the course of this screening work, our research group have put together a large library of natural and semi-synthetic compounds obtained from the Canadian boreal forest biomass. This library is a precious tool to identify new valuable bioproducts for the discovery of cosmeceuticals, nutraceuticals, pesticides, food preservatives and antiparasitic agents. Since the library contains isolated and characterized natural products as well as derivatives, positive results on an assay lead directly to the active principle. Future use of this library could rapidly lead to the development of new bioproducts.

An urgent need for broader development of natural products as bioproducts is the potential markets evaluation. Natural products have a wide range of potential commercial uses (Tripathi et Dubey 2004; Thornfeldt 2005; Wetzal et al. 2006b; Baumann 2007; Copping et Duke 2007; Espín et al. 2007; Davis et Perez 2009; Dayan et al. 2009; Epstein 2009), but little is known about the potential return they can generate. An accurate evaluation of the potential profit associated with bioactive natural products would guide investors before committing themselves to the production. Finally, green extraction, isolation and transformation processes need to be develop to limit the environmental impacts of bioactive natural products processing. Since biorefineries are seen as a way to reduce the greenhouse gas emission, processes

integrated into the facility must have a minimal ecological footprint. Such green processes could facilitate the introduction of bioactive natural products into Canadian forest-based biorefineries.

CHAPITRE 3

REVUE DE LA LITTÉRATURE

3.1 LE GENRE *POPULUS* ET LE PEUPLIER BAUMIER (*POPULUS BALSAMIFERA* L.)

3.1.1 Taxinomie, morphologie, habitat et distribution

Avant de s'attarder à la composition chimique et aux activités biologiques des métabolites secondaires issus des espèces du genre *Populus*, il est essentiel de connaître les caractéristiques qui définissent ce genre ainsi que l'espèce à l'étude, *P. balsamifera*. Le genre *Populus* fait partie de la famille des Salicaceae et partage plusieurs similarités avec le genre *Salix* (les saules) de cette même famille. Il est généralement accepté que le genre est constitué de 29 espèces divisées en 6 sections (tableau 4), bien que ce nombre puisse varier selon les sources consultées. En effet, les hybridations naturelles entre espèces d'une même section ou de sections différentes sont fréquentes ce qui vient compliquer la classification des espèces de ce genre.

Tableau 4: Classification des espèces de *Populus* selon les sections du genre (Eckenwalder 1996)

Sections	Espèces	Distributions
Abaso Eckenwalder	<i>Populus mexicana</i> Wesmael	Mexique
Turanga Bunge	<i>P. euphratica</i> Olivier	Afrique, Asie
	<i>P. ilicifolia</i> (Engler) Rouleau	Afrique
	<i>P. pruinosa</i> Schrenk	Asie
Leucoides Spach	<i>P. glauca</i> Haines	Chine
	<i>P. heterophylla</i> L.	États-Unis
	<i>P. lasiocarpa</i> Olivier	Chine

Tableau 4 (suite)

Sections	Espèces	Distribution
Aigeiros Duby	<i>P. deltoides</i> Marshall	Amérique du Nord
	<i>P. fremontii</i> S. Watson	États-Unis
	<i>P. nigra</i> L.	Europe, Asie, Afrique
Tacamahaca Spach	<i>P. augustifolia</i> James	Amérique du Nord
	<i>P. balsamifera</i> L.	Amérique du Nord
	<i>P. ciliata</i> Royle	Asie
	<i>P. laurifolia</i> Ledebour	Europe, Asie
	<i>P. simonii</i> Carrière	Asie
	<i>P. suaveolens</i> Fischer	Chine, Japon
	<i>P. szechuanica</i> Schneider	Europe, Asie
	<i>P. trichocarpa</i> Torrey & Gray	Amérique du Nord
	<i>P. yunnanensis</i> Dode	Europe, Asie
	Populus (Leuce Duby)	<i>P. adenopoda</i> Maximowicz
<i>P. alba</i> L.		Europe, Asie, Amérique du Nord
<i>P. gamblei</i> Haines		Europe, Asie
<i>P. grandidentata</i> Michaux		Amérique du Nord
<i>P. guzmanantlensis</i> Vazques & Cuevas		Mexique
<i>P. monticola</i> Brandegees		Mexique
<i>P. sieboldii</i> Miquel		Japon
<i>P. simaroa</i> Rzedowski		Mexique
<i>P. tremula</i> L.		Europe, Afrique, Asie
<i>P. tremuloides</i> Michaux		Amérique du Nord

Communément appelées peuplier ou tremble, les plantes du genre *Populus* peuvent être décrites comme des arbres à feuilles caduques et à durée de vie courte. Ces arbres peuvent tout de même atteindre de grandes tailles grâce à leur croissance rapide. Une caractéristique distinctive du genre est l'apparition de fleurs sous la forme de chatons (figure 6) juste avant la feuillaison. Les feuilles et les fleurs sont précédées par des bourgeons qui apparaissent à la fin de la saison de croissance et qui restent en dormance pendant l'hiver avant d'éclore au printemps. Ces bourgeons sont couverts d'un exsudat résineux, une autre caractéristique distinctive du genre (figure 6) (Eckenwalder 1996).

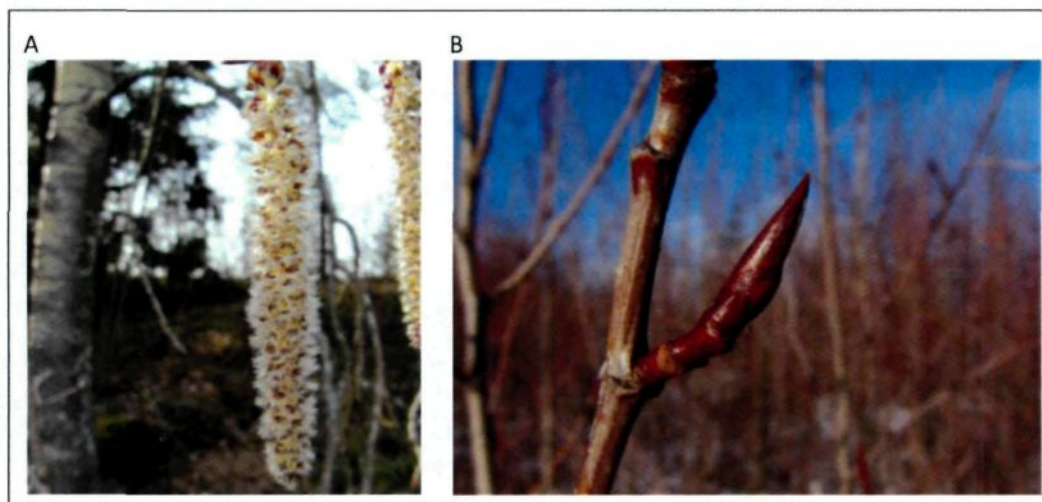


Figure 6: Chatons de *P. tremula* (A) et bourgeons latéraux de *P. trichocarpa* (B)
(Crédit: Allan Carson, 2005, Aleza Lake Research Forest Plant System Database)

Les différentes espèces de *Populus* poussent dans des habitats variés allant des régions chaudes et arides d'Asie centrale ou d'Afrique, aux régions alpines et boréales d'Europe et d'Amérique du Nord (tableau 4) (Slavov et Zhelev 2010). Au Québec, on retrouve 6 espèces du genre, dont les espèces indigènes les plus répandues sont le peuplier faux-tremble (*P. tremuloïdes*) et le peuplier baumier (*P. balsamifera* L) (Marie-Victorin 2002)

L'espèce à l'étude, le peuplier baumier, a été classée dans la section Tacamahaca (tableau 4). Elle est présente presque partout au Canada, au nord des États-Unis ainsi qu'en Alaska (figure 7). Elle pousse surtout dans les endroits humides comme en bordure de rivières ou de lacs et dans les marais, bien qu'on puisse aussi l'apercevoir dans des sites plus secs (Dickmann 2001). Le peuplier baumier est un arbre de taille moyenne pouvant atteindre jusqu'à 35 m de hauteur qui possède des feuilles ovales vertes foncé sur le dessus et plus pâles en dessous. Ces dernières ont un contour denté et sont souvent parsemées de taches brunes. Son écorce lisse verdâtre ou brun rougeâtre devient grise et écailleuse en vieillissant. Une caractéristique distinctive du peuplier baumier est certainement le parfum balsamique de l'exsudat qui recouvre ses bourgeons au printemps.

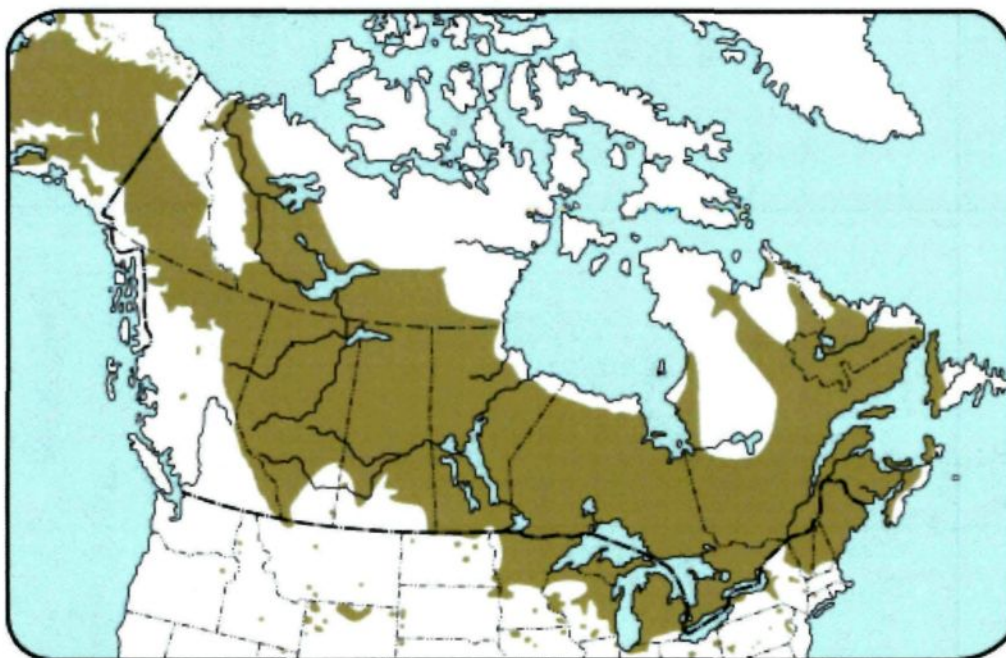


Figure 7: Carte de la distribution géographique de *P. balsamifera*
(Natural Resources Canada 2012)

3.1.2 Génétique et génomique

Dès le début du vingtième siècle, il a été établi que les peupliers constituaient d'excellents modèles pour étudier la transmission des traits génétiques. En effet, l'hybridation entre espèces s'effectue relativement facilement et les effets génotypiques s'observent rapidement grâce à sa croissance rapide. De plus, les traits acquis sont bien conservés lors de la multiplication végétative (Ellis et al. 2010). Ces avantages ont favorisé la recherche d'hybrides de plus en plus performants pour la production de biomasse et du même coup, l'accumulation de connaissances plus approfondies sur la génétique du genre *Populus*. En 2006, *P. trichocarpa* est devenu le premier arbre dont le génome a été complètement élucidé (Tuskan et al. 2006). Cette découverte a déjà permis d'accumuler beaucoup de nouvelles connaissances sur la biologie du genre (Jansson et al. 2010). Ces nouvelles connaissances devraient avoir un impact majeur sur l'exploitation et la transformation des espèces du genre *Populus* dans les années à venir. La prochaine section s'intéresse aux utilisations commerciales actuelles, mais aussi à des utilisations futures potentielles des espèces du genre *Populus*.

3.1.3 Utilisations commerciales actuelles et potentielles

Les utilisations commerciales du bois des espèces de *Populus* du Canada ont été en constante évolution au cours des 50 dernières années et d'importants changements sont encore à prévoir. Avant 1970, les espèces du genre étaient perçues comme indésirables alors qu'on leur préférait les bois de conifères possédant des propriétés mieux adaptées à la production de matériaux de construction et de papier. Au cours des années 1970, l'augmentation du coût de la fibre issue des conifères et la grande disponibilité du bois des espèces du genre *Populus* ont favorisé une exploitation grandissante par l'industrie forestière. À ce moment, l'industrie des pâtes et papiers était l'utilisatrice principale de la fibre de *Populus*. L'introduction sur le marché de nouveaux types de panneaux de particules, pour lesquels le bois de *Populus* était mieux adapté, a fait quadrupler le volume d'exploitation entre 1975 et le début des années 2000 (Balatinecz et Kretschmann 2001). Encore aujourd'hui, les pâtes et papiers et les produits composites demeurent les principaux produits commerciaux dérivés du bois des peupliers.

À cause de leur croissance rapide, les peupliers sont considérés comme d'excellents candidats pour fournir de la biomasse aux futures bioraffineries. Les connaissances acquises suite à l'élucidation du génome du *P. trichocarpa* devraient permettre de développer des clones possédant des caractéristiques de plus en plus favorables pour la production de biocarburants et d'autres bioproduits. Cet intérêt renouvelé pour la biomasse issue des espèces du genre *Populus* favorise la mise en place de cultures de peupliers de plus en plus imposantes. En 2008, on évaluait que les terres allouées à la plantation et à l'agroforesterie de peupliers représentaient plus de 5 225 000 hectares (Stanton et al. 2010), faisant des peupliers un des genres d'arbres les plus cultivés de la zone tempérée. L'efficacité de la multiplication végétative, le haut rendement de la biomasse, l'efficacité de l'aménagement en régime de taillis et une bonne adaptation aux changements environnementaux favorisent cette sylviculture grandissante (Dillen et al. 2010).

Enfin, mentionnons qu'il existe actuellement peu de produits commerciaux dont la matière première est constituée de métabolites secondaires de peupliers. L'absolu obtenu des bourgeons de *P. nigra*

semble être utilisé dans les industries des saveurs, des fragrances et des cosmétiques (Rubiolo et al. 2013). Une étude récente a aussi démontré qu'un extrait aqueux de bourgeons de *P. nigra* possédait des propriétés favorisant une utilisation potentielle dans la formulation de produits nutraceutiques anti-âge (Dudonné et al. 2011). L'huile essentielle de bourgeons de *P. balsamifera* est commercialisée au Canada par la compagnie AlikSir. Ces utilisations plus fines possèdent probablement un potentiel commercial, mais demeurent pour le moment des voies d'exploitation plutôt marginales. L'acquisition de connaissances plus approfondies sur les propriétés des métabolites secondaires des espèces du genre *Populus* pourrait contribuer à valoriser de nouveaux bioproduits.

3.1.4 Utilisations médicinales traditionnelles

Quoique moins célèbre, l'utilisation en médecine traditionnelle des espèces de *Populus* est liée à celle des saules, leurs proches cousins. Vers 400 avant notre ère, Hippocrate recommandait une préparation issue d'écorces de saule blanc pour soulager la douleur lors de l'accouchement (Elwood 2001). On sait aujourd'hui que cette activité analgésique est due à la présence de salicyline dans les écorces de saule. L'Aspirin®, un des médicaments les plus utilisés dans le monde encore aujourd'hui, a été synthétisé pour la première fois suite à cette découverte. Comme pour les saules, les écorces, les feuilles et les bourgeons de peupliers contiennent de la salicyline ainsi que d'autres glycosides phénoliques dérivés de cette dernière (section 3.1.5.2). Des études ethnobotaniques issues du Moyen-Orient et de l'Asie mentionnent diverses préparations à base de *Populus* qui étaient utilisées pour leurs effets antiphlogistique (anti-inflammatoire), analgésique, antibactérien, spasmolytique, antipyrétique, diurétique, stimulant et dépuratif (Al-Hussaini et Mahasneh 2009; Pant 2010; Dudonné et al. 2011; Kumar et Bhagat 2012; Mikaili et al. 2012). Plusieurs de ces effets reposent probablement sur la présence des glycosides phénoliques dérivés de la salicyline. Une particularité concernant l'ethnobotanique des espèces du genre *Populus* est l'utilisation répandue des bourgeons. La commission E, une compilation des monographies allemandes, mentionne l'utilisation externe de préparations obtenues à partir de bourgeons de peupliers pour traiter les blessures

cutanées, les hémorroïdes, les engelures et les coups soleils grâce à une action antibactérienne et cicatrisante (Blumenthal et al. 1998). Les bourgeons de peuplier sont aussi associés à la propolis, une substance largement utilisée en médecine traditionnelle de plusieurs cultures autour du monde. La propolis et sa relation avec les bourgeons de peuplier sont décrites plus en détail à la section 3.2.

Les études concernant l'utilisation des plantes médicinales par les populations autochtones d'Amérique du Nord révèlent que le peuplier baumier (*P. balsamifera*) et le peuplier faux-tremble (*P. tremuloides*) étaient des espèces particulièrement prisées des guérisseurs. En effet, une revue récente des utilisations traditionnelles des plantes médicinales de la forêt boréale du Canada désigne ces deux espèces parmi celles les plus communément utilisées (Uprety et al. 2012). Moerman, lors de ses travaux imposants concernant l'ethnobotanique des autochtones d'Amérique a aussi inclus *P. balsamifera* dans sa liste des dix espèces ayant le plus grand nombre d'utilisations traditionnelles (Moermann 1998). Le tableau 5 présente une compilation des principales utilisations en médecine traditionnelle des différentes parties de *P. balsamifera*. Les bourgeons étaient largement utilisés pour un large éventail de problèmes de santé allant du rhume au diabète. L'application de différents types de préparations sur les blessures, les coupures, les plaies, les engelures et les piqûres d'insectes suggèrent que les bourgeons pourraient posséder une action antibactérienne prévenant l'infection. Ces informations ont donc été très importantes dans l'élaboration de ce projet de recherche. La sève, les écorces, les feuilles, les chatons, les racines et le bois étaient aussi parfois utilisés par les autochtones, entre autres pour prévenir les infections.

Tableau 5: Compilation des utilisations en médecine traditionnelle de *P. balsamifera*

Parties	Préparations	Utilisation médicinale	Références
Bourgeons	Baume préparé en faisant bouillir les bourgeons avec de la graisse d'ours	Appliqué sur les engelures et sur les plaies	(Uprety et al. 2012)
	Thé	Rhume	
	Baume appliqué aux narines	Pour stopper les saignements de nez	
	Broyé avec <i>Arctium lappa</i>	Appliqué sur les plaies	
	Cataplasme	Entorses ou déchirures musculaires	
	Baume	Coupures, blessures, contusions et congestions	
	Vapeurs	Congestion nasale et bronchique	
	Bain imprégné	Eczéma et psoriasis	(Marles et al. 1999)
	Frotté directement ou infusion	Douleur due aux poussées dentaires et maux de dents	
	Décoction	Problèmes cardiaques	
	Bouilli avec des écorces de <i>P. tremuloides</i>	Diabète	
	Cataplasme alcoolique	Blessures	(Moermann 1998)
	Teinture	Rhumatismes chroniques	
	Jus des bourgeons	Plaies	
	Teinture	Coliques et problèmes d'intestin	
Teinture	Affections vénériennes		
Décoction préparée avec une matière grasse appliquée aux narines	Rhume		
Décoction préparée avec une matière grasse appliquée aux narines	Blessures		
Sève	Breuvage	Diabète et hypertension artérielle	(Marles et al. 1999)
	Thé	Douleur à la poitrine	(Uprety et al. 2012)
	Utilisé directement	Coupures	

Tableau 5 (suite et fin)

Parties	Préparations	Utilisation médicinale	Références
Écorces	Inclus dans une décoction d'un mélange de plantes	Helminthoses	(Moermann 1998)
	Inclus dans une décoction d'un mélange de plantes	Laxatif	
Écorces et sève	thé	Asthme	(Slavov et Zhelev 2010)
Feuilles	Appliquer directement	Plaies	(Slavov et Zhelev 2010)
Racines	Mâcher puis appliquer	Piqûres d'insectes	(Slavov et Zhelev 2010)
	Cataplasme	Plaies ouvertes ou infectées	
Écorces internes	Décoction avec <i>Cirsium</i> sp.	Faiblesse et maux de dos chez les femmes	(Slavov et Zhelev 2010)
	-	Diabète	
Chatons	Bouillis	Problèmes d'estomac	(Slavov et Zhelev 2010)
	Bouillis	Enflures	
Bois	Thé	Problèmes respiratoires	(Slavov et Zhelev 2010)
	Pourri, en poudre	Éruptions cutanées	

3.1.5 Composition chimique des extractibles du genre *Populus*

Puisque les extractibles sont principalement issus du métabolisme secondaire des plantes, leur composition peut varier de façon importante entre les espèces d'un même genre ainsi qu'entre les différents organes d'un même individu. Pour cette raison, une revue exhaustive de la composition chimique des extractibles du genre *Populus* serait trop imposante. Cette section a plutôt comme objectif de décrire les composés représentatifs du genre qui sont soit communs à plusieurs espèces, soit distinctifs de certaines espèces ou de certaines sections du genre.

L'étude de la composition chimique des extractibles de *Populus* remontent jusqu'en 1830 (figure 8), année à laquelle Henri Braconnot isole pour la première fois la salicyline (41) et la populine (42) dans un extrait de *P. tremula* (Braconnot 1830). Bien sûr, les structures exactes de ces composés n'étaient pas connues à l'époque. Au cours des années 1960 et 1970, les travaux de pionnier du groupe de Pearl ont permis d'isoler plusieurs autres composés de structure apparentée à la salicine à partir des feuilles et des

écorces de différentes espèces de *Populus* (Pearl et Darling 1959; Pearl et Darling 1962; Pearl et Darling 1968a; Pearl et Darling 1968c). Ces composés sont aujourd'hui catégorisés en tant que glycosides phénoliques dérivés de la salicyline (section 3.1.5.2) et sont typiques des extractibles de *Populus*. Viennent ensuite les imposants travaux du groupe de Greenaway dans les années 1990 sur les extractibles de bourgeons et d'exsudats de bourgeons de plusieurs espèces de peupliers (Greenaway et al. 1990; Greenaway et Whatley 1990a; Greenaway et Whatley 1990b; Greenaway et al. 1991; Greenaway et al. 1992b). Ces travaux ont mis en évidence la présence de plus de 60 petits composés dont près de 70 % étaient des esters d'acide hydroxycinnamique (section 3.1.5.1). Notons aussi que ces travaux mentionnent la présence de plusieurs flavonoïdes (section 3.1.5.3), une autre catégorie de composés typiques des espèces du genre *Populus*. Plus récemment, le séquençage du génome de *P. trichocarpa* (Tuskan et al. 2006) a renouvelé l'intérêt envers les produits du métabolisme secondaire des peupliers. Ainsi, il faut mentionner les travaux du groupe de Tsai qui ont porté sur les gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes du genre *Populus*. Ces travaux contiennent de nombreuses informations concernant la distribution des différentes classes de composés dérivés des phénylpropanoïdes dans le genre *Populus* (Tsai et al. 2006). Enfin, dans le cadre d'une revue de littérature portant sur les interactions des métabolites secondaires du genre *Populus* avec des éléments biotiques et abiotiques de l'environnement, Chen *et al* ont rassemblé les informations disponibles concernant les principales classes de métabolites secondaires présents dans les extractibles de *Populus* (Chen et al. 2009). Les prochaines sections s'intéressent aux quatre classes de composés qui sont caractéristiques des peupliers, soit les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés estérifiés, les glycosides phénoliques dérivés de la salicyline, les flavonoïdes et les proanthocyanidines. La section qui vient ensuite présente un bref survol des autres métabolites secondaires du genre *Populus* qui ne font pas partie de ces quatre classes de composés.

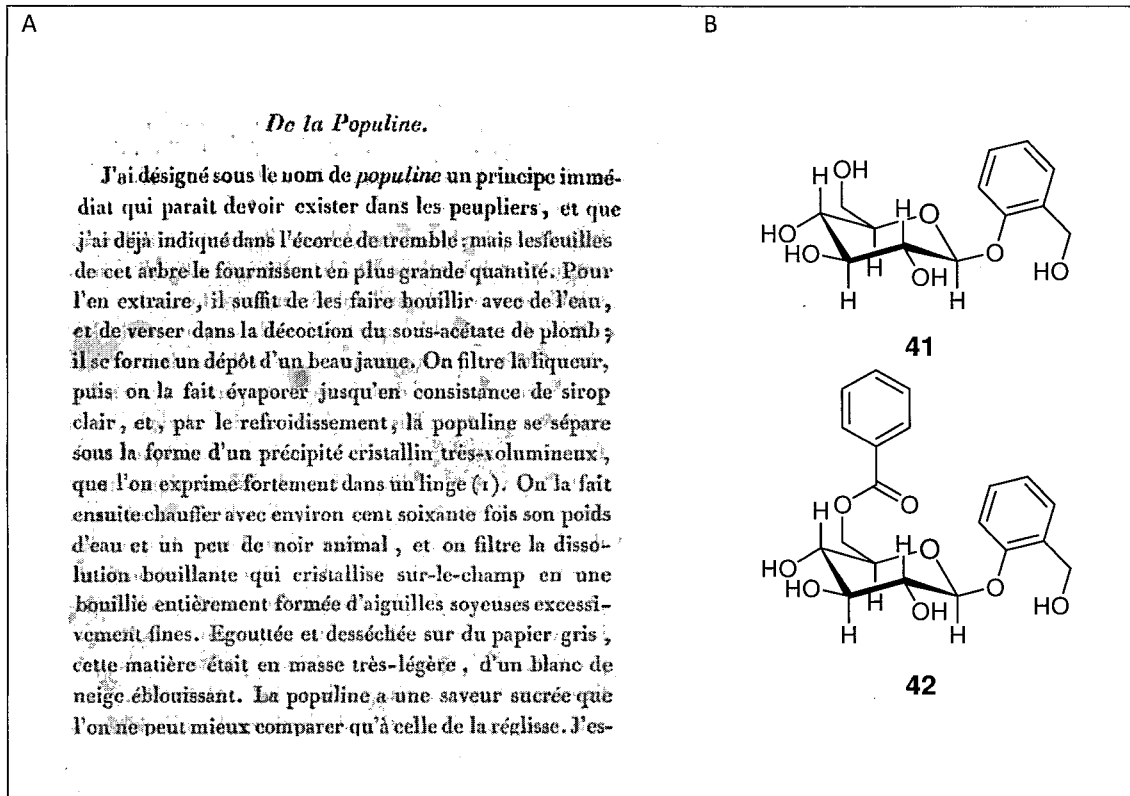


Figure 8: Extrait de l'article de Henri Bragnotot relatant l'isolement de la populine pour la première fois (A) et structures de la salicyline (41) et de la populine (42) (B)

Tiré de: Annales de chimie et de physique, volume 44, page 311-312, 1830.

3.1.5.1 Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés estérifiés

Les acides hydroxycinnamiques sont des composés omniprésents chez les plantes. Leurs biosynthèses se déroulent d'abord par la déamination de la phénylalanine ou de la tyrosine par la phénylalanine ammonia-lyase ou la tyrosine ammonia lyase ce qui génère respectivement l'acide cinnamique (43) et l'acide *p*-coumarique (44). Des hydroxylations et des méthoxylations à différentes positions (figure 9) peuvent ensuite générer d'autres acides hydroxycinnamiques comme l'acide caféique (45), l'acide férulique (46), l'acide 5-hydroxyférulique (47) et l'acide synaptique (48). Via la voie métabolique des phénylpropanoïdes, ces acides hydroxycinnamiques sont des intermédiaires dans la biosynthèse des lignines, des lignanes, des coumarines, des flavonoïdes, des stilbènes et bien sûr des esters d'acides hydroxycinnamiques (figure 9). Des revues de la littérature plus approfondies concernant la biosynthèse des

acides hydroxycinnamiques et leurs transformations subséquentes ont récemment été publiées (Umezawa 2010; Vogt 2010).

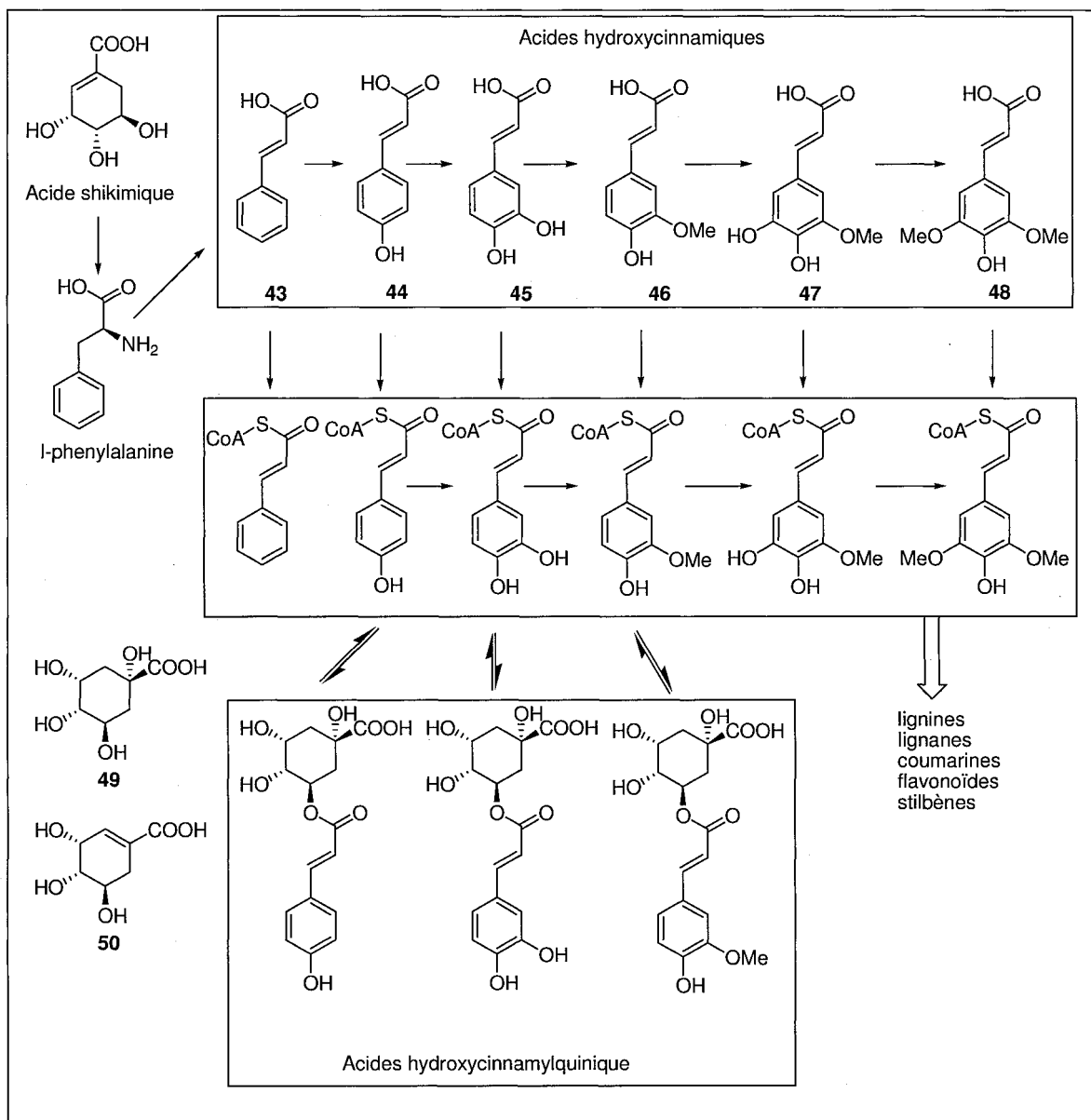


Figure 9: Biosynthèse des acides hydroxycinnamiques et de leurs esters de quinate
Adapté de Tsai *et al.* (2006).

Les acides hydroxycinnamiques se retrouvent fréquemment sous la forme d'esters de différents alcools (acide tartrique, acide malique, acide quinique, glucose) en plus d'estérifier fréquemment les hydroxyles de nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les anthocyanosides et les

saponosides (Bruneton 1999). Les travaux de Tsai *et al* (2006) ont permis de démontrer que les espèces du genre *Populus* exprimaient une famille étendue d'hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transférases. Les enzymes de cette famille sont responsables de l'estérification des composés de la famille des acides hydroxycinnamiques par l'acide quinique (49) et l'acide shikimique (50). On retrouve d'ailleurs une grande diversité d'acides hydroxycinnamoylquiniques (tableau 6) qui constituent entre 2 et 8 % du poids sec des feuilles du genre *Populus*. Le plus répandu de ces esters est l'acide chlorogénique (Tsai et al. 2006). Il faut préciser que le terme acide chlorogénique est aussi utilisé pour désigner la famille regroupant les composés constitués d'un ou plusieurs acides hydroxycinnamiques conjugués à l'acide quinique. D'autres esters largement distribués dans le genre *Populus*, soient des acides hydroxycinnamiques isoprénylés et benzylés ainsi que des benzoates d'hydroxycinnamyle ont été identifiés à partir d'exsudats de bourgeons et de feuilles (Greenaway et al. 1992b). Il est également intéressant de noter que l'accumulation de certains esters d'acide hydroxycinnamique est spécifique à quelques espèces et que cette particularité a été utilisée en classification taxinomique. Par exemple, l'exsudat de bourgeons de *P. trichocarpa* (section Tacamahaca) contient plusieurs acides cinnamiques et coumariques ainsi que des esters de ces derniers alors qu'ils sont absents de l'exsudat de *P. deltoides* (section Aigeiros). Cette spécificité a été mise à profit dans la détermination des espèces parentes de différents hybrides de *Populus* (Greenaway et al. 1992a). Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés estérifiés sont donc largement distribués et présents en quantité importante dans les extractibles de feuilles et de bourgeons du genre *Populus*. Certains sont par contre spécifiques à des sections du genre, ce qui permet de les utiliser comme marqueur pour la classification taxinomique.

Tableau 6: Distribution de certains acides hydroxycinnamiques et leurs esters dans différentes espèces du genre *Populus*.^a

Composés	Aigeiros			Tacamahaca		Populus	
	<i>P. augustifolia</i> ^b	<i>P. fremontii</i>	<i>P. deltoides</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>P. balsamifera</i>	<i>P. grandidentata</i> <i>P. tremuloides</i>
Acide 1-coumaroylquinique			×	ND			×
Acide 3-coumaroylquinique			×	ND			×
Acide 4-coumaroylquinique	×	×		ND	×	×	×
Acide 5-coumaroylquinique	×	×		ND	×		×
Acide 4- <i>cis</i> -caféoylquinique	×	×		ND			×
Acide 1-caféoylquinique		×	×	ND	×	×	×
Acide 3-caféoylquinique	×	×	×	ND	×	×	×
Acide 4-caféoylquinique	×	×	×	ND	×	×	×
Acide 5-caféoylquinique	×	×	×	ND	×	×	×
Acide 4- <i>cis</i> -caféoylquinique				ND			
Acide 1-feruloylquinique		×	×	ND			×
Acide 1-feruloylquinique			×	ND			
Acide 1-feruloylquinique		×		ND			
Acide 1-feruloylquinique	×	×		ND			
Acide cinnamique (43)	×	ND	×	×	×	×	ND ND
Acide <i>p</i> -coumarique (44)		ND	×	×	×	×	ND ×
Cinnamate de coumaryle		ND		×	×	ND	ND ND
Coumarate de cinnamyle		ND		×	×	ND	ND ND
<i>cis</i> -Caféate de 3-méthyl-3-butenyle	ND	ND	ND	×	ND		ND
<i>cis</i> -Caféate de 3-méthyl-2-butenyle	ND	ND	ND	×	ND		ND
<i>cis</i> -4-Coumarate de benzyle	ND	ND	ND		ND		ND ×
<i>trans</i> -Caféate de 3-méthyl-3-butenyle	×	ND		×		×	ND
<i>trans</i> -Caféate de 3-méthyl-2-butenyle	×	ND		×			ND
<i>trans</i> -4-Coumarate de benzyle		ND		×		×	ND ×
<i>cis</i> -Caféate de benzyle	ND	ND	ND		ND		ND ×
Benzoate de confiféryle	ND	ND	ND		ND		ND ×
<i>trans</i> -Caféate de benzyle	×	ND	×	×			ND ×

^aRéférences: (Greenaway et al. 1992a; Greenaway et al. 1992b; Isidorov et Vinogorova 2003; Tsai et al. 2006). ^b*P. augustifolia* est conventionnellement classé dans la section Tacamahaca, mais ses caractéristiques chimiotaxinomiques sont typiques de la section Aigeiros (Greenaway et Whatley 1990a). ND: non disponible

3.1.5.2 Les glycosides phénoliques dérivés de la salicyline

Contrairement aux acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés, les glycosides phénoliques dérivés de la salicyline sont spécifiques à la famille des Salicaceae. Leur abondance dans certaines espèces du genre *Populus* est élevée. En effet, une concentration moyenne de salicortine (51) aussi élevée que 13 % du poids sec de la plante a été rapportée pour de jeunes plants de *Populus tremuloides* (Donaldson et al. 2006). Il s'agit aussi d'une classe de composés restreinte puisqu'encore aujourd'hui, seulement une vingtaine de

structures (**41**, **42**, **51-70**) ont été rapportées (figure 10). Le squelette de base de cette classe de composés est formé d'une unité alcool salicylique dont la fonction phénolique est impliquée dans un lien éther avec le carbone anomérique d'une unité β -D-glucose. Les variations observées sur ce squelette sont des estérifications au niveau de l'hydroxyle libre de l'alcool salicylique et des hydroxyles en positions 2' et 6' de l'unité β -D-glucose (figure 10). Les acides communément impliqués dans ces liaisons esters sont l'acide benzoïque, des acides hydroxycinnamiques ou l'acide 1-hydroxy-6-oxocyclohex-2-ène (HCH). Quelques composés possèdent exceptionnellement une unité d'alcool gentsylique plutôt qu'une unité d'alcool salicylique (Boeckler et al. 2011). La biosynthèse de cette classe de composés n'est pas bien connue, mais il semble que l'unité alcool salicylique provienne de la voie métabolique des phénylpropanoïdes (figure 9). Suite à l'hydroxylation de l'acide cinnamique pour former l'acide *o*-coumarique, ce dernier subirait un raccourcissement de la chaîne latérale (Boeckler et al. 2011). Une β -oxydation semblable au processus de dégradation des acides gras pourrait expliquer le raccourcissement de la chaîne, mais d'autres mécanismes sont aussi considérés (Chen et al. 2009). La façon exacte dont se déroulent ensuite la glucosylation et les différentes estérifications au niveau des hydroxyles n'est pas connue. La salicortine (**51**) et la salicyline (**41**) sont les deux composés de cette classe les plus largement répandus dans les extractibles des différentes espèces du genre *Populus*. D'autres sont plus spécifiques, comme la deltoïdine (**53**) qui n'a été identifiée que chez *P. deltoides* jusqu'à maintenant. Une revue approfondie de la distribution des glycosides phénoliques dérivés de la salicyline dans le genre *Populus* a été publiée récemment (Boeckler et al. 2011).

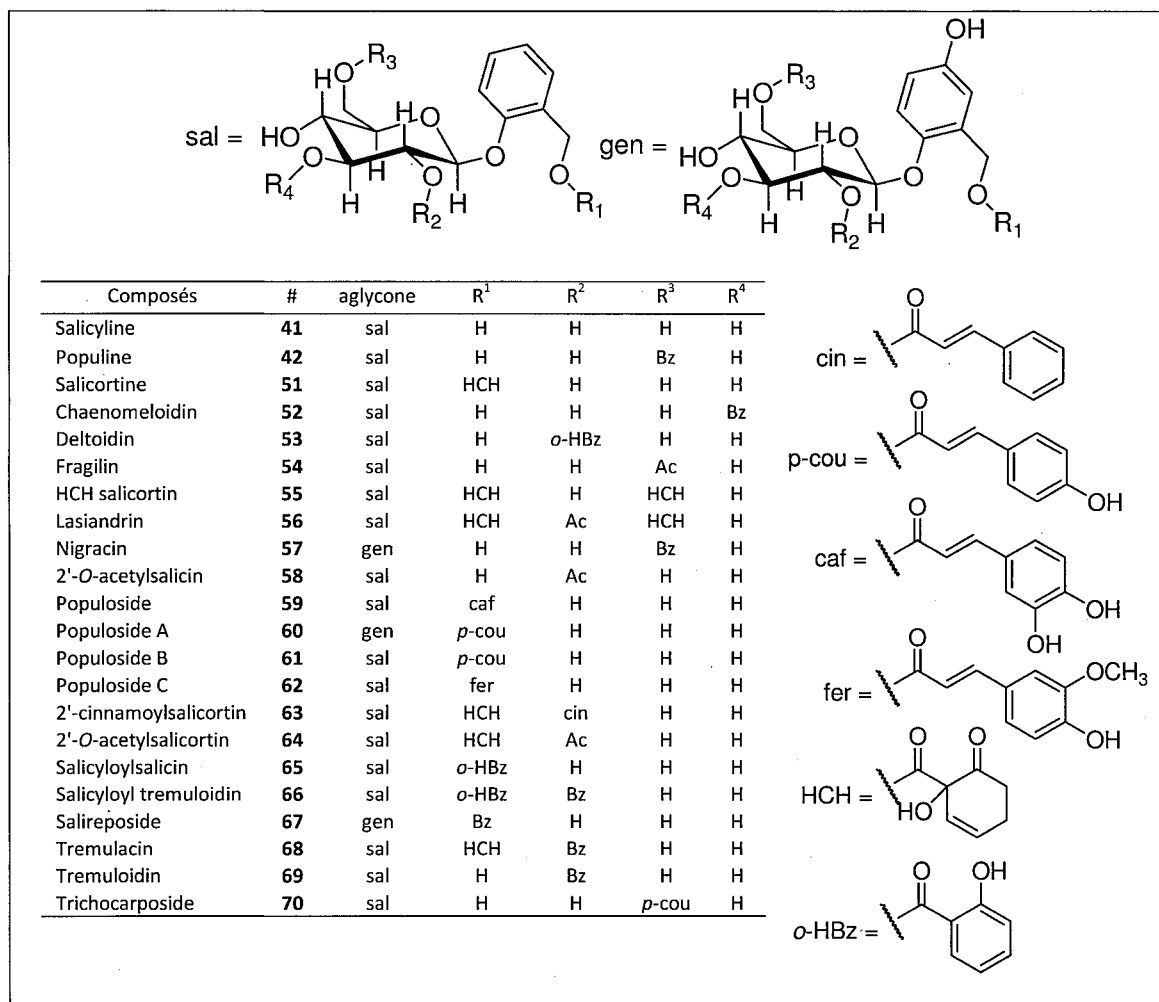


Figure 10: Structures des glycosides phénoliques dérivés de la salicyline (Boeckler et al. 2011)

3.1.5.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont omniprésents dans le règne végétal. Ils représentent un groupe de composés très diversifiés qui est divisé en différentes classes structurales. Les espèces du genre *Populus* contiennent des flavonoïdes appartenant à 8 de ces classes, soit les chalcones, les dihydrochalcones, les flavanones, les flavones, les dihydroflavonols, les flavonols, les anthocyanines et les flavan-3-ols (figure 11). La biosynthèse des flavonoïdes est bien connue (Winkel-Shirley 2001). Sommairement, les chalcones sont d'abord obtenues par la condensation d'un 4-coumaroyl CoA issu du métabolisme des phénylpropanoïdes (figure 9) et d'un triacétate issu de la voie des polyacétates. Une condensation de Claisen suivie d'une série d'énolisations

catalysées par la famille des chalcone synthases permet de former le second cycle aromatique de la chalcone. Le cycle pyranique est quant à lui formé à la suite d'une attaque nucléophile de type Michael d'un des hydroxyles du cycle A sur la liaison double de l'unité coumaroylé (figure 11). Cette dernière étape est catalysée par des enzymes de la famille des chalcone isomérase. Vient ensuite une série d'hydroxylations, de méthyloxylation, de déshydrogénations et de réductions qui mènent aux différentes classes de flavonoïdes ainsi qu'à leurs variations structurales (Winkel-Shirley 2001). Les gènes codant pour les enzymes impliqués dans plusieurs étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ont été identifiés dans le génome du genre *Populus* (Morreel et al. 2006; Tsai et al. 2006). Bien que toutes les espèces de *Populus* contiennent des flavonoïdes, les travaux de Greenaway et de son équipe ont permis d'établir des spécificités dans la distribution des différentes classes. Par exemple, l'exsudat de bourgeons de *P. balsamifera*, une espèce de la section Tacamahaca est riche en dihydrochalcones, alors que l'exsudat de bourgeons de *P. deltoides* (section Aigerios) n'en contient pas et est plutôt riche en flavanones (Greenaway et al. 1990). Il est aussi intéressant de noter qu'une abondance de flavonoïdes particulièrement élevée a été détectée dans les nœuds de *P. grandidentata*, *P. tremuloides* et *P. tremula*. En effet, les nœuds de *P. tremula* peuvent contenir jusqu'à 31 mg/g de bois lyophilisé de dihydrokaempférol alors que le bois de cœur et l'aubier en contiennent moins de 0,34 mg/g de bois lyophilisé (Pietarinen et al. 2006b). Les flavonoïdes peuvent donc être exprimés en quantité importante dans certains organes des espèces du genre *Populus* et la distribution des différentes classes de flavonoïdes varie en fonction des sections du genre.

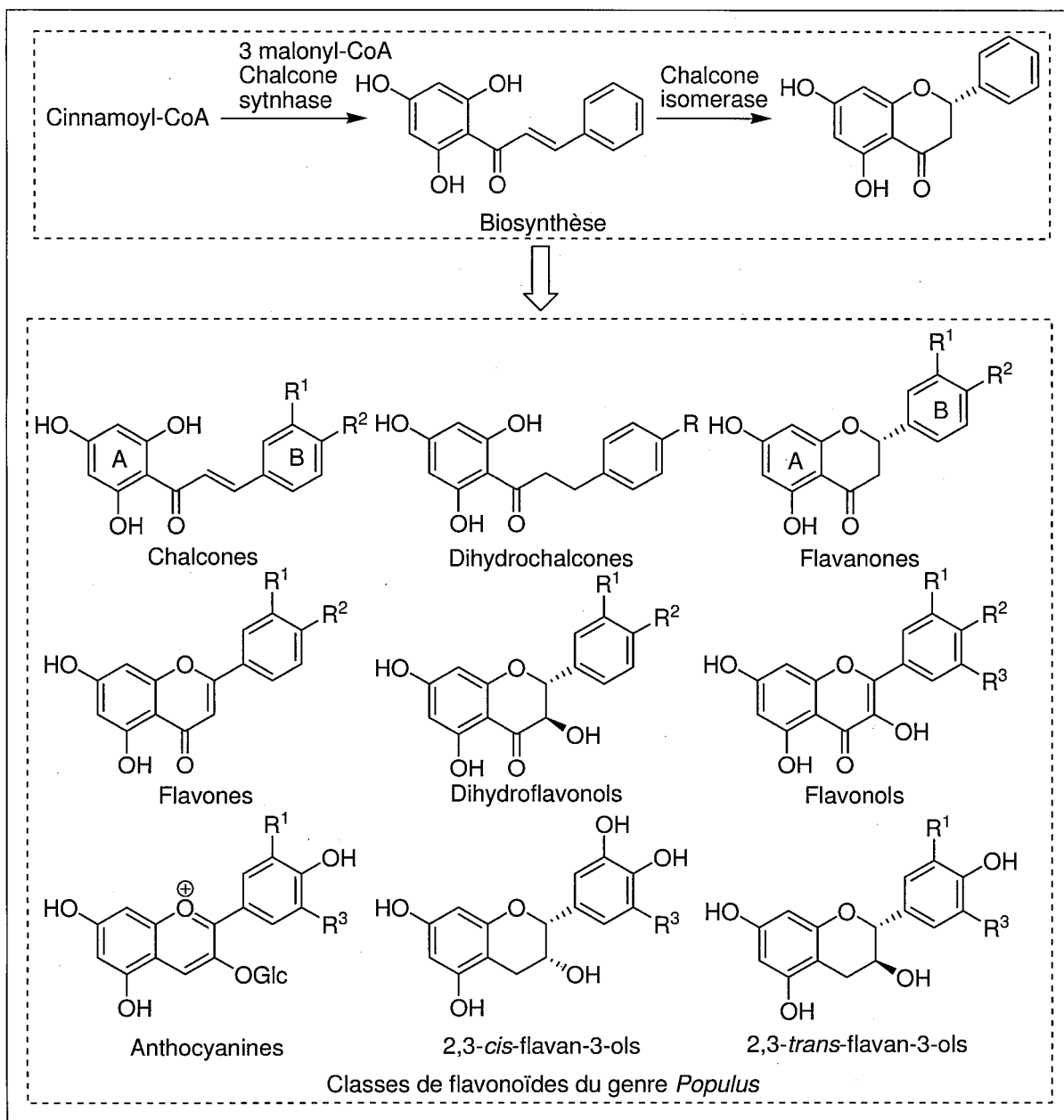


Figure 11: Classes de flavonoïdes contenues dans les espèces du genre *Populus* (Tsai et al. 2006).

3.1.5.4 Les proanthocyanidines

Les proanthocyanidines, aussi appelés tanins condensés, sont des oligomères ou des polymères d'unités flavan-3-ols raccordés par des liens carbone-carbone (figure 12). Cette classe de composés partage donc une partie de son origine biosynthétique avec les flavonoïdes de la classe des flavan-3-ols. La façon

exacte dont se déroule la polymérisation des unités flavan-3-ols demeure incertaine, mais il semble que les flavan-3-ols soient d'abord glycosylés avant d'être transportés dans les vacuoles par des protéines de transport (Zhao et al. 2010). Les proanthocyanidines se retrouvent à la fois dans les feuilles et dans les tissus ligneux du genre *Populus*. Leur abondance est cependant très variable puisque leur accumulation est affectée par plusieurs facteurs environnementaux tels que les dommages provoqués par des insectes (Chen et al. 2009). Une concentration aussi élevée que 18 % du poids sec des feuilles a été rapportée (Chen et al. 2009). Les proanthocyanidines et les glycosides phénoliques dérivés de la salicyline peuvent représenter jusqu'à 35 % du poids sec des feuilles des espèces du genre *Populus* (Tsai et al. 2006).

À cause de leur nature polymérique, l'analyse structurale des proanthocyanidines s'effectue généralement par des méthodes indirectes de lyses suivies par l'identification et la quantification des unités lysées par colorimétrie ou par HPLC. Une méthode particulièrement intéressante combine la thiolysé à l'analyse HPLC des produits formés. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les unités flavan-3-ols terminales se retrouvent libres alors que les unités d'allongement de la chaîne sont obtenues en tant que dérivés thiols (figure 12). Il est donc possible d'obtenir une approximation du degré de polymérisation moyen grâce au rapport quantitatif des unités d'allongement et des unités terminales. Cette méthode a été appliquée pour caractériser les proanthocyanidines de différentes espèces de *Populus*, ce qui a permis de démontrer que la nature des proanthocyanidines est dépendante de la parenté génétique. Ainsi, les proanthocyanidines de *P. balsamifera*, *P. tremuloides* et *P. angustifolia* sont composées de monomères de types procyanidine et prodelfinidine (figure 12) dans des proportions variables (Ayles et al. 1997; Scioneaux et al. 2011). Dans le cas de *P. fremontii*, seulement le type procyanidine a été observé. Pour ce qui est de la longueur de la chaîne, on retrouve chez *P. angustifolia* des polymères composés de 20 à 28 unités flavan-3-ols alors que des dimères caractérisent plutôt *P. fremontii*. Ces travaux démontrent que même si les proanthocyanidines sont présentes dans toutes les espèces du genre *Populus*, leurs structures peuvent varier grandement d'une espèce à l'autre.

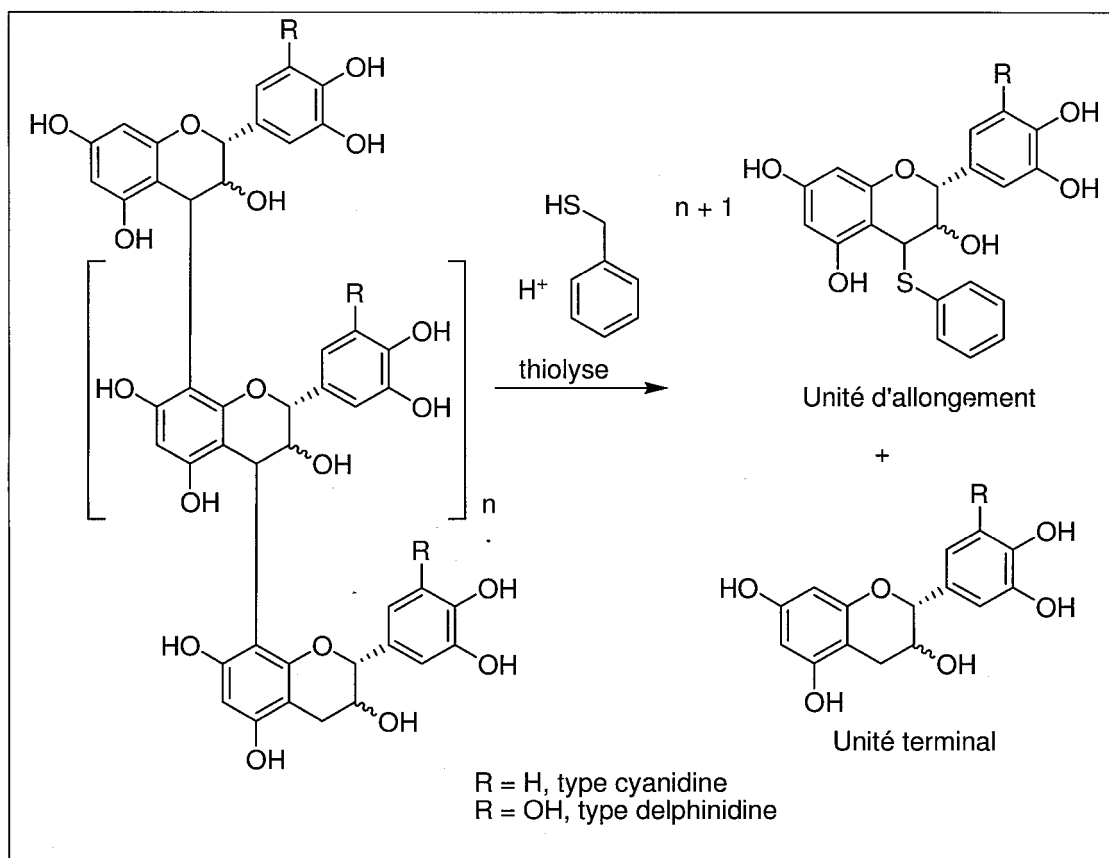


Figure 12: Structure générale des proanthocyanidines et résultats de la thiolyse

3.1.4.5 Les autres métabolites secondaires

Les études concernant des métabolites secondaires autres que les quatre classes décrites précédemment sont peu nombreuses dans la littérature. Les espèces du genre *Populus* possèdent tout de même des gènes de la famille des terpènes synthases (Danner et al. 2011), gènes qui sont responsables de la biosynthèse des terpènes. La majorité des études portant sur les terpènes issus des espèces du genre *Populus* s'intéressent aux volatiles dégagés par les feuilles dans l'atmosphère, l'isoprène étant le plus important (Schnitzler et al. 2010). Il a aussi été démontré que l'activité des terpènes synthases augmente lorsque des dommages sont causés aux feuilles par certains herbivores (Danner et al. 2011). Cette activité induite se traduit par une augmentation de la production de sesquiterpènes, particulièrement le (-)-germacrène D (**71**) et le (*E,E*)- α -farnésène (**72**) (Danner et al. 2011) (figure 13).

Le bois des espèces du genre *Populus* se différencie des autres organes et tissus par sa composition chimique. Il contient entre autres des stérols et des triterpènes dont l'abondance a été évaluée à près de 3000 mg/kg de bois lyophilisé (Fernandez et al. 2002). Une étude s'intéressant aux composés moins polaires ainsi qu'aux volatiles présents dans les exsudats de bourgeons de *P. balsamifera* a aussi montré la présence de sesquiterpènes représentant environ 37 % des composés détectés par GC/MS (Isidorov et Vinogorova 2003).

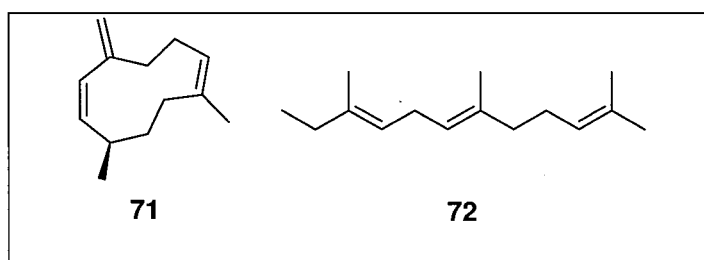


Figure 13: Le (-)-germacrène D (**71**) et le (*E,E*)- α -farnésène (**72**)

3.1.6 Composition chimique des extractibles de *P. balsamifera*

Cette section contient une revue relativement exhaustive de la littérature scientifique concernant les métabolites secondaires identifiés à partir de différents organes de *P. balsamifera*. Comme pour les autres espèces du genre, les études portant sur le peuplier baumier s'intéressent surtout aux composés phénoliques. Ces derniers sont principalement distribués entre 5 sous-classes, soit les phénols simples, les acides phénoliques, les glycosides phénoliques dérivés de la salicyline, les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés esters et les flavonoïdes. Aucune information concernant la composition des proanthocyanidines de *P. balsamifera* n'a pu être relevée. Tous les composés phénoliques recensés ainsi que leurs structures et leurs provenances ont été compilés dans le tableau 7.

Tableau 7: Composition en composés phénoliques des extractibles de *P. balsamifera*, avec leur source

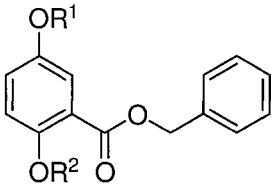
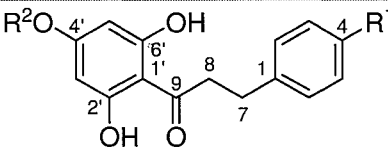
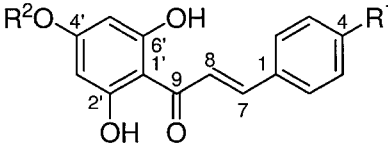
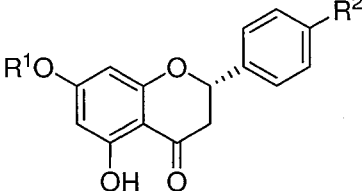
Familles	#	Noms	Structures	Sources ¹	Références
Glycosides phénoliques dérivés de la salicyline	41	Salicyline		Ec.	(Pearl et Darling 1968c)
	51	Salicortine			
	59	Populoside			
	65	Salicyloylsalicine			
	67	Salireposide			
	70	Trichocarposide			
	73	Trichoside			
	74	Trichocarpine	<p>73 R¹ = Glc; R² = CH₃ 74 R¹ = H; R² = Glc</p>		
Dihydro- chalcones	75	2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone		Exs.	(Greenaway et al. 1989; Greenaway et Whatley 1990b)
	76	2',6'-dihydroxy-4',4'-dimethoxydihydrochalcone			
	77	2',4',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone			
	78	2',6',4-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone			
	79	2',4',6',4'-tetrahydroxydihydrochalcone			
	80	2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone			
		<p>75 R¹ = R² = H 76 R¹ = OCH₃, R² = CH₃ 77 R¹ = OCH₃, R² = H 78 R¹ = OH, R² = CH₃ 79 R¹ = OH, R² = H 80 R¹ = H, R² = CH₃</p>			
Chalcone	81	2',4',6'-trihydroxychalcone		Exs.	(Greenaway et al. 1989; Greenaway et Whatley 1990b; Greenaway et al. 1992b)
	82	2',6'-dihydroxy-4',4'-dimethoxychalcone			
	83	2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone			
	84	2',4',6'-trihydroxy-4'-methoxychalcone			
	85	2',6',4-trihydroxy-4'-methoxychalcone			
	86	2',4',6',4'-tetrahydroxychalcone			
		<p>81 R¹ = R² = H 82 R¹ = OCH₃, R² = CH₃ 83 R¹ = H, R² = CH₃ 84 R¹ = OCH₃, R² = H 85 R¹ = OH, R² = CH₃ 86 R¹ = OH, R² = H</p>			
Flavanones	87	Pinocembrin		Exs.	(Greenaway et Whatley 1990b; Kurkin et al. 1990)
	88	Pinostrobin			
	89	Sakuranetin			
	90	Naringenin			
	91	5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavanone			
		<p>87 R¹ = R² = H 88 R¹ = CH₃, R² = H 89 R¹ = CH₃, R² = OH 90 R¹ = H, R² = OH 91 R¹ = H, R² = OCH₃</p>			

Tableau 7 (suite)

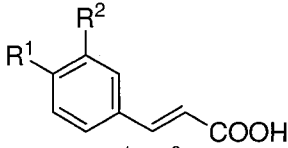
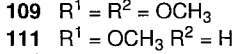
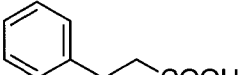
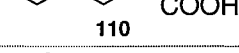
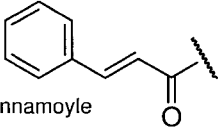
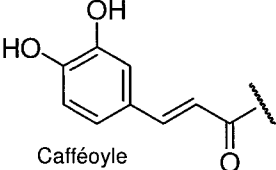
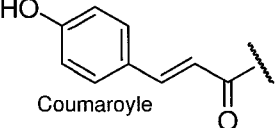
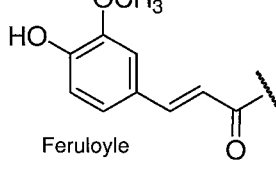
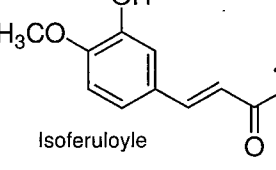
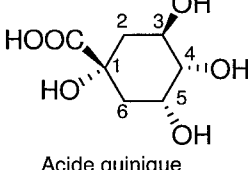
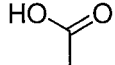
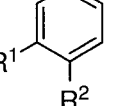
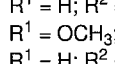
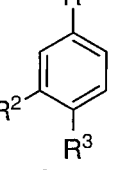
Familles	#	Noms	Structures	Sources ¹	Références
Acides hydroxy-cinnamiques	43	Acide cinnamique	(43, 44, 45, 46, voir figure 9)	Exs.	(Greenaway et al. 1992a)
	44	Acide <i>p</i> -coumarique		Éc.	(Abramovitch et al. 1967)
	46	Acide férulique		B.	(Pearl et Darling 1968b)
	109	Acide 3,4-dimethoxycinnamique	 109 R ¹ = R ² = OCH ₃		(Isidorov et Vinogorova 2003)
	110	Acide dihydrocinnamique	 111 R ¹ = OCH ₃ R ² = H		
	111	Acide 4-methoxycinnamique	 110		
45	Acide caféique				
Esters d'acides hydroxy-cinnamiques	112	Acide 1-caféoylquinique	 Cinnamoyle	Exs.	(Greenaway et Whatley 1990b; Greenaway et al. 1992b)
	113	Acide 3-caféoylquinique			
	114	Acide 4-caféoylquinique			
	115	Acide 5-caféoylquinique			
	116	<i>trans</i> -4-Coumarate de benzyle	 Cafféoyle		
	117	<i>trans</i> -Caféate de 3-methyl-3-butenyle			
	118	<i>trans</i> -Caféate de 2-methyl-3-butenyle			
	119	<i>trans</i> -Caféate de 3-methyl-2-butenyle	 Coumaroyle		
	120	<i>trans-p</i> -coumarate de phenylethyl			
	121	<i>trans-p</i> -coumarate de geranyl	 Feruloyle		
	122	<i>trans</i> -isoferulate de phenylethyl			
	123	<i>trans</i> -cinnamate de cinnamyl	 Isoferuloyle		
	124	<i>trans</i> -caffeate de phenylethyl			
125	<i>trans</i> -cinnamate de coumaryl				
126	<i>trans-p</i> -coumarate de cinnamyl				
127	<i>trans</i> -ferulate de cinnamyl				
128	<i>trans</i> -cinnamate d'éthyle				
129	3,4-dimethoxycinnamate de méthyle	 Acide quinique		(Isidorov et Vinogorova 2003)	

Tableau 7 (suite et fin)

Familles	#	Noms	Structures	Sources ¹	Références	
Acides phénoliques	130	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque		Ec.	(Abramovitch et al. 1967)	
	131	Acide vanillique				
	132	Acide benzoïque		130 R ¹ = H; R ² = OH 131 R ¹ = OCH ₃ ; R ² = OH 132 R ¹ = H; R ² = H	B.	(Isidorov et Vinogorova 2003)
Phénols simples	133	Alcool salicylique		Ec.	(Pearl et Darling 1968c)	
	134	Alcool gentisylrique				
	135	Pyrocatechol				
	136	Trichocarpigénin				
	137	Salicaldéhyde			B.	(Mattes et al. 1987)
	138	Alcool benzylique		133 R ¹ = H; R ² = OH; R ³ = CH ₂ OH 134 R ¹ = OH; R ² = CH ₂ OH; R ³ = OH 135 R ¹ = H; R ² = R ³ = OH		(Reichardt et al. 1990)
	139	2-phényléthanol		136 R ¹ = OH; R ² = CO ₂ Bz; R ³ = OH 137 R ¹ = H; R ² = COH; R ³ = OH	B.	(Isidorov et Vinogorova 2003)
	140	Benzoate d'éthyle		138 R ¹ = CH ₂ OH; R ² = R ³ = H 139 R ¹ = CH ₂ CH ₂ OH; R ² = R ³ = H		
	141	Eugenol		140 R ¹ = CO ₂ CH ₂ CH ₃ ; R ² = R ³ = H 141 R ¹ = allyle; R ² = OCH ₃ ; R ³ = OH		
	142	Phénol		142 R ¹ = OH; R ² = R ³ = H		

¹B: Bourgeons, Exs.: Exsudats de bourgeons, Ec.: Écorces

Huit différents glycosides phénoliques (**41**, **51**, **59**, **65**, **67**, **70**, **73** et **74**) ont été identifiés à partir des écorces du tronc et des tiges par le groupe de Pearl dès la fin des années 1960. Le trichoside (**73**) et la trichocarpine (**74**) se distinguent des autres glycosides phénoliques par le fait qu'ils soient dérivés de l'acide gentisique plutôt que de l'alcool gentisique. La majorité des travaux effectués par la suite ont porté sur des extraits de bourgeons ou d'exsudats de bourgeons. La contribution la plus importante est venue de la part du groupe de Greenaway à la fin des années 1990. Des analyses en profondeur de la composition chimique des bourgeons par GC/MS ont entre autres permis d'établir que les dihydrochalcones (**75-80**) étaient les composés majoritaires des bourgeons. Plusieurs autres types de flavonoïdes y ont aussi été retrouvés, soit des chalcones (**81-86**), des flavanones (**87-91**), des dihydroflavonols (**92-99**), des flavones (**100-102**) et des flavonols (**103-108**). Les bourgeons contiennent aussi un large éventail d'acides hydroxycinnamiques (**43-46**

et **109-111**), mais surtout d'esters d'acide hydroxycinnamiques (**112-129**). Les acides phénoliques (**130-132**) et les phénols simples (**133-142**) sont, quant à eux, présents en nombres plus restreints.

Bien que les extractibles de type terpénique ne soient pas majoritaires chez *P. balsamifera*, la composition en terpènes volatiles des bourgeons a été étudiée à quelques reprises. Ainsi, plus d'une dizaine de monoterpènes et près d'une trentaine de sesquiterpènes ont pu être détectés (tableau 8) (Mattes et al. 1987; Reichardt et al. 1990; Isidorov et Vinogorova 2003; Piochon 2008). En terminant, il est intéressant de mentionner que la présence d'alcanes (Isidorov et Vinogorova 2003), d'acides aliphatiques (Abramovitch et al. 1967), d'acides gras (Polyakov et al. 1985; Isidorov et Vinogorova 2003), de sucres et de prostaglandines (Levin et al. 1990) a également été rapportée dans *P. balsamifera*.

Tableau 8: Terpènes volatiles issus des bourgeons de *P. balsamifera*

Familles	Noms	Provenances	Références
Monoterpènes	(+)- α -pinène	Entraînement à la vapeur des bourgeons	(Mattes et al. 1987; Reichardt et al. 1990; Piochon 2008)
	(-)- α -pinène		
	β -pinène		
	myrcène		
	1,8-cineol		
	γ -terpinène		
	α -terpinène		
	(+)-terpinen-4-ol		
	(-)-terpinen-4-ol		
	(\pm)- α -terpineol		
	limonène		
Sesquiterpènes	α -bergamotène	Bourgeons	(Mattes et al. 1987; Reichardt et al. 1990)
	β -farnesène		
	δ -cadinène		
	<i>trans</i> -nerolidol		
	(+)- α -bisabolol		
	(-)- α -bisabolol	Bourgeons	(Isidorov et Vinogorova 2003)
	β -caryophyllène		
	isocaryophyllène		
	γ -curcumène		
	α -curcumène		
	β -selinène		
	δ -guaïène		
	β -bisabolène		
	oxyde de caryophyllène		
	guaïol		
	10- <i>epi</i> - γ -eudesmol		
	β -eudesmol		
α -eudesmol			
bulnesol			

Tableau 8 (Suite et fin)

Familles	Noms	Provenances	Références		
Sesquiterpènes (suite)	α -ygangène	Bourgeons	(Isidorov et Vinogorova 2003)		
	α -copaène				
	α -cedrène				
	6,9-guaiadiène				
	α -humulène				
	<i>trans</i> -cadin-1(6),4-diène				
	γ -muurolène				
	α -amorphène				
	δ -selinène				
	γ -amorphène			Bourgeons	(Piochon 2008)
	α -selinène				
	epizoarène				
	α -muurolène				
	β -guaiène				
	δ -amorpène				
	β -curcumène				
	γ -cadinène				
	β -sesquiphellandrène				
	zonarène				
	<i>trans</i> -cadin-1,4-diène				
	α -cadinène				
	selina-3,7-diène				
	α -coracorène				
	fokienol				
	1,10-di-epi-cubenol				
	τ -muurolol				
	τ -cardinol				
oxyde d' α -bisabolol B					
α -muurolol					
α -cadinol					
oxyde de β -bisabolol B					
β -bisabolol					
epi- β -bisabolol					

3.1.7 Activités biologiques

Il est surprenant de constater que peu de travaux scientifiques ont été effectués dans le but d'évaluer les activités biologiques des métabolites secondaires du genre *Populus*. L'activité antioxydante a été la plus souvent étudiée. L'activité antioxydante des écorces de *P. euphratica*, *P. ussuriensis* et *P. davidiana* a été associée à la présence de glycosides phénoliques (Zhang et al. 2006b; Si et al. 2009; Si et al. 2011; Pal et al. 2012) alors que celle des bourgeons de *P. Nigra* a été associée à la présence d'acides hydroxycinnamiques (Dudonné et al. 2011). L'activité antioxydante de composés de la famille des acides hydroxycinnamiques a d'ailleurs été confirmée sur différents modèles *in vitro* et *in vivo* (Shahidi et Chandrasekara 2010). En complément à l'activité antioxydante, il a été démontré que l'extrait de bourgeons

de *P. nigra* pouvait aussi réguler certains gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, la réponse inflammatoire et le renouvellement des cellules de la peau (Dudonné et al. 2011). De leur côté, les extractibles issus des nœuds et des écorces de *P. grandidentata*, *P. tremula* et *P. tremuloides* ont montré un potentiel antioxydant faible en comparaison avec d'autres espèces d'arbres commerciales (Pietarinen et al. 2006a). Parmi les autres activités biologiques documentées pour le genre *Populus*, on retrouve l'activité antibactérienne des bourgeons (Vardar-Ünlü et al. 2008; Kuchukhidze et al. 2011) et de flavonoïdes issus des rameaux (Zhong et al. 2012), l'activité antivirale de glycosides phénoliques issus des feuilles (Van Hoof et al. 1989), l'activité anti-inflammatoire de flavonoïdes et de glycosides phénoliques issus des feuilles (Zhang et al. 2006a; Lee et al. 2012) et l'activité anticancéreuse de composés phénoliques issus des bourgeons (Mazzio et Soliman 2009; Pichette et al. 2010). Certains glycosides phénoliques issus des écorces ont aussi été étudiés pour leur capacité à prévenir les réactions allergiques (Ogawa et al. 2006) alors que l'influence sur les capacités et l'endurance physique, de l'ingestion d'une préparation de *P. tremula*, a été évaluée *in vivo* (Kurkin et al. 2006).

Dans le cas particulier de *P. balsamifera*, les études concernant la bioactivité des métabolites secondaires sont encore plus rares. Un intérêt particulier a été porté à l'implication que pourraient avoir certains métabolites de l'écorce interne dans le traitement de l'obésité et du diabète. Il a d'abord été démontré qu'un extrait d'écorce interne possédait des propriétés cytoprotectives permettant d'inhiber la toxicité chronique du glucose *in vitro* (Harbilas et al. 2009). Par la suite, la salicortine a été identifiée comme étant le composé responsable d'une activité inhibitrice de l'adipogenèse (Martineau et al. 2010). Enfin, des études sur souris ont permis de démontrer *in vivo* que ce même extrait diminuait le gain de poids et l'accumulation de triglycérides en plus d'abaisser la glycémie (Harbilas et al. 2012). Dans un cadre complètement différent, il a été rapporté que certains métabolites présents dans les bourgeons de *P. balsamifera* leur conféraient une protection contre certains herbivores comme le lièvre d'Amérique (Reichardt et al. 1990). Enfin, une étude effectuée au LASEVE a récemment permis de montrer que l'huile

essentielle des bourgeons de *P. balsamifera* possédait une activité anticancéreuse *in vitro* et que cette activité était en partie attribuable à la présence de *trans*-nerolidol et de α -bisabolol dans l'huile (Piochon 2008).

3.2 LA PROPOLIS

La revue de la littérature pertinente dans le cadre de cette thèse ne serait pas complète sans un survol de la littérature concernant les relations qui existent entre l'exsudat des bourgeons de peupliers et la propolis. Avant d'explorer les similarités entre ces deux matrices, il est nécessaire de définir sommairement la propolis. Les abeilles du genre *Apis* produisent la propolis en mélangeant la résine qu'elles récoltent de différentes plantes avec une cire produite par leurs glandes. Les abeilles utilisent la propolis, entre autres, pour seller les crevasses et les trous de leur ruche ou pour enrober les corps de petits animaux s'étant introduits dans la ruche pour éviter leur putréfaction (Salatino et al. 2011). Dès l'Antiquité, les Égyptiens, les Grecs et les Romains utilisaient la propolis pour traiter les blessures, la douleur et les ulcères (Salatino et al. 2011). Son utilisation à des fins thérapeutiques s'est perpétuée au fil des siècles, si bien qu'il est aujourd'hui devenu un produit de santé naturelle populaire dans plusieurs régions du monde. Cette popularité en a fait un sujet de recherche largement abordé dans la littérature scientifique. Des propriétés antioxydantes (Kumazawa et al. 2004), anticancéreuse (Watanabe et al. 2011), immunomodulatrice (Sforcin 2007) et antimicrobienne (Fokt et al. 2010) ont été démontrées pour différents types de propolis. À cause de sa portion résineuse issue des plantes, la composition chimique de la propolis est très variable. La provenance de cette résine peut être assez facilement identifiée puisque les abeilles n'y apportent pas de modifications. Une simple comparaison de la composition chimique de la propolis et des sources végétales potentielles permet généralement d'identifier la source réelle. Il a ainsi été établi que la résine contenue dans la propolis récoltée en zone tempérée provenait principalement de l'exsudat des bourgeons de différentes espèces de peupliers (Salatino et al. 2011). Au Canada, des analyses de la composition chimique de propolis récoltée en forêt boréale ont révélé que les composés majoritaires étaient des acides hydroxycinnamiques indiquant du même coup que la résine provenait d'exsudats de bourgeons de peupliers de la section Aigeiros tel que *P.*

tremuloides. Par contre, la propolis récoltée sur la côte pacifique en dehors de la distribution géographique des espèces de la section Aigeiros était riche en dihydrochalcones indiquant que *P. trichocarpa* de la section Tacamahaca en était la source (Christov et al. 2006). Il devient de plus en plus clair que les substances responsables des activités biologiques de la propolis sont celles provenant de la résine récoltée sur les plantes. Les exsudats de bourgeons de peuplier pourraient donc présenter des activités biologiques similaires à celles de la propolis. Vardar-Ünlü et ses collègues ont d'ailleurs démontré que des extraits de bourgeons de *P. nigra*, *P. alba* et *P. tremula* étaient aussi efficaces que le propolis pour inhiber la croissance de plusieurs bactéries et champignons (Vardar-Ünlü et al. 2008). Il existe cependant très peu d'études s'intéressant au potentiel pharmacologique des exsudats de bourgeons de peupliers.

3.3 LES DÉRIVÉS DE DIHYDROCHALCONES ET LEUR ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

L'identification des trois dérivés de dihydrochalcone (**1-3**) inhibant significativement la croissance de *S. aureus in vitro* indique que ces composés sont en partie responsables de l'activité antibactérienne de l'extrait des bourgeons de *P. balsamifera*. Qu'en est-il de la littérature disponible au sujet de l'activité antibactérienne des dihydrochalcones et des flavonoïdes en général? Cette dernière section de la revue de littérature s'intéresse particulièrement aux relations entre les structures et l'activité antibactérienne des flavonoïdes et surtout des dihydrochalcones. Les flavonoïdes ont fait l'objet de nombreuses études s'intéressant à leurs propriétés antibactériennes comme le démontrent les revues de littérature à ce sujet effectuées par Cushnie et Lamb en 2005 et en 2011 (Cushnie et Lamb 2005; Cushnie et Lamb 2011). L'accumulation de résultats sur l'activité antibactérienne d'une grande variété de structures flavonoïdiques a permis d'établir certains traits structuraux qui influencent cette activité. Par exemple, la présence d'une fonction hydroxyle en position ortho ou para de la carbonyle des flavonoïdes (cycle A, figure 11) semble augmenter leur activité. Une autre tendance remarquable est que les chalcones montrent une activité antibactérienne contre les staphylocoques plus marquée que les flavanones et les flavones (Alcaraz et al. 2000). D'ailleurs, l'activité antibactérienne des chalcones est aussi l'objet de revues de littérature publiées récemment (Cushnie et Lamb 2011; Rahman 2011; K. Sahu et al. 2012). Dans le cas des chalcones, il semble

que la présence d'un groupement lipophile sur le cycle A (figure 11) soit un facteur déterminant de l'ordre de grandeur de l'activité antibactérienne (Cushnie et Lamb 2011). Par exemple, les chalcones possédant des groupements prényle ou géranyle ont une activité antibactérienne particulièrement marquée (Ávila et al. 2008). Les études concernant l'activité antibactérienne des dihydrochalcones (figure 11) sont moins nombreuses, mais quelques-unes sont particulièrement intéressantes pour établir des relations avec les composés **1-3**. Quatre dihydrochalcones, substituées par des groupements benzyles (**143-146**), issues d'*Uvaria angolensis* ont inhibé la croissance de *Bacillus subtilis*, *S. aureus* et *Mycobacterium smegmatis* avec des CMI variant entre 0,2 et 12,5 µg/ml (Hufford et Oguntimein 1980; Hufford et Oguntimein 1982; Hufford et al. 1987). Ces résultats ont permis à Hufford *et al.* de conclure que le potentiel antibactérien de ces dihydrochalcones reposait sur la présence d'un groupement alkyle sur le cycle A (figure 14). Awouafack *et al.* ont obtenu des résultats allant dans le même sens en démontrant l'activité antibactérienne de deux dihydrochalcones substituées par des unités isoprènes, les erioschalcones A (**147**) et B (**148**) isolés de *Eriosema glomerata* (Awouafack et al. 2008). Une étude établissant des relations structure-activité grâce à l'hémisynthèse de dérivés des composés **147** et **148** suggère aussi l'induction de l'activité antibactérienne par la présence d'un groupement alkyle sur le cycle A des dihydrochalcones (Awouafack et al. 2010). Les résultats obtenus avec les composés **1-3** suggèrent aussi que l'activité antibactérienne des dihydrochalcones repose sur la présence d'un substituant alkyle sur le cycle A. Les travaux, présentés dans cette thèse, traitent d'une large gamme de composés antibactériens issus des bourgeons de *P. balsamifera*, ce qui permettra d'en apprendre davantage sur ce potentiel « scaffold » antibactérien.

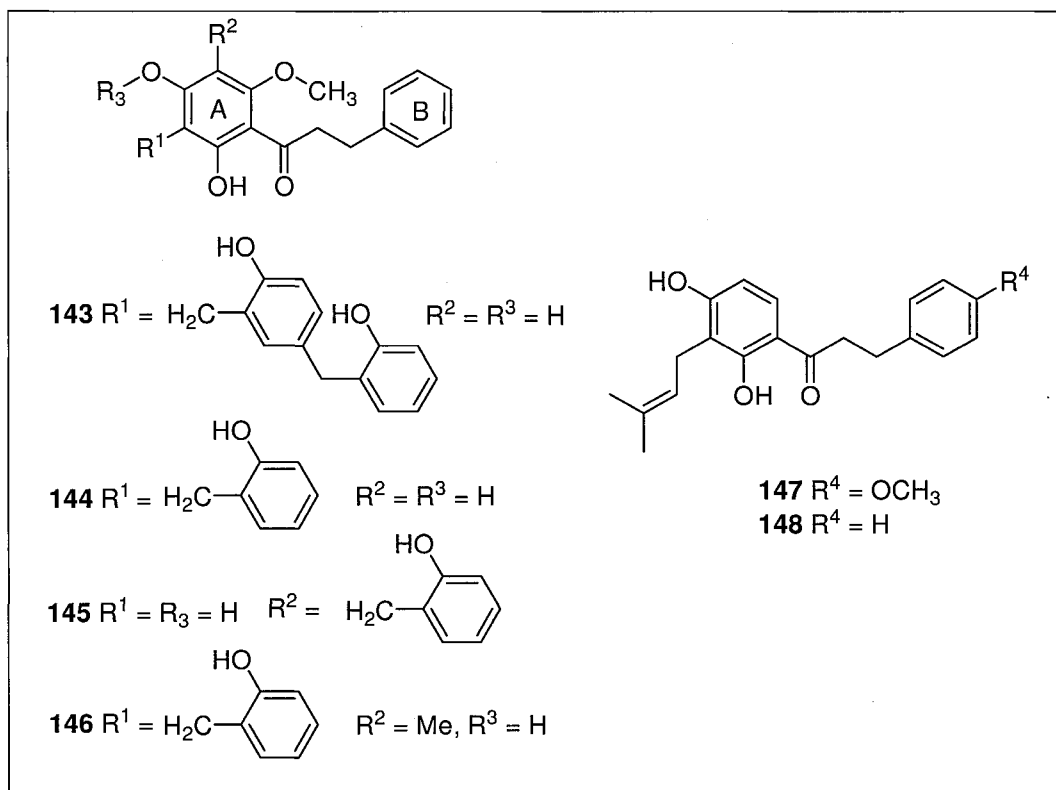


Figure 14: Structures de dérivés de dihydrochalcones possédant des propriétés antibactériennes

CHAPITRE 4

NEW ANTIBACTERIAL DIHYDROCHALCONE DERIVATIVES FROM BUDS OF *POPULUS BALSAMIFERA*

Serge Lavoie^a, Jean Legault^a, François Simard^a, Éric Chiasson^a and André Pichette^{a,*}

^a Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

* Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011; fax: +1 418 545 5012. E-mail address: andre_pichette@uqac.ca (A. Pichette).

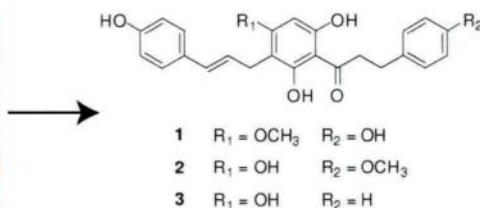
(Article publié dans Tetrahedron letters 2013, 54, 1631-1633)

Keywords: Dihydrochalcone, *Populus balsamifera*, Antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, NMR

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (S. Lavoie) a rédigé toutes les sections du manuscrit et a effectué l'analyse RMN des composés. E. Chiasson et F. Simard ont effectué l'isolement des composés. F. Simard a aussi contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit. J. Legault et A. Pichette sont respectivement les codirecteur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



RÉSUMÉ

Trois nouveaux dérivés de dihydrochalcone, les balsacones A, B et C, ainsi que deux acides hydroxycinnamiques et cinq dihydrochalcones ayant déjà été rapportés, ont été isolés à partir de bourgeons de *P. balsamifera*. La caractérisation des structures des nouveaux composés a été effectuée grâce à l'analyse de données spectrales (RMN, IR et spectre de masse). Parmi les 10 composés isolés, seulement les balsacones A, B et C ont montré une activité antibactérienne en inhibant la croissance de *S. aureus* à des concentrations variant entre 3,1 et 6,3 μM .

ABSTRACT

Three new dihydrochalcone derivatives, balsacones A, B and C, along with seven known compounds, were isolated from the buds of *Populus balsamifera*. The structures of the new compounds were elucidated by the analysis of spectroscopic data. Only balsacone A, B and C were significantly active against *Staphylococcus aureus* with MIC values ranging from 3.1 to 6.3 μM .

INTRODUCTION

Populus balsamifera L., belonging to the Salicaceae family, is a tree inhabiting almost all part of North America (Marie-Victorin 2002). The American aboriginals prepared ointment from its buds to treat wounds (Van Wyk et Wink 2004) suggesting that this substance might act as a protection against infections. This traditional use, combined to recent results indicating that buds extracts from other *Populus* species possess antimicrobial activity (Vardar-Ünlü et al. 2008), prompted new investigation on a *P. balsamifera* buds extract to identify antimicrobial compounds. Previous phytochemical studies on *P. balsamifera* buds resulted in the identification of alkanes (Isidorov et Vinogorova 2003), fatty acids (Polyakov et al. 1985; Isidorov et Vinogorova 2003), terpenes (Mattes et al. 1987; Isidorov et Vinogorova 2003), phenols (Greenaway et al. 1989; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), flavonoids (Greenaway et al. 1989; Kurkin et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), chalcones (Greenaway et al. 1989; Kurkin et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), carbohydrates (Isaeva et Ryazanova 2006) and prostaglandins (Levin et al. 1990). Herein are reported the isolation and structural elucidation of three new dihydrochalcone derivatives, characterized as balsacones A–C (**1–3**), together with seven known compounds (Figure 15). All isolates were tested for biological activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and normal skin fibroblast (WS1).

RESULTS AND DISCUSSION

Crushed and air-dried buds of *P. balsamifera* (875 g) were extracted with refluxing aqueous ethanol of increasing polarity (5 % to 30 % H₂O). Solvent partition of the combined aqueous EtOH extracts followed by column chromatographic separations and semi-preparative HPLC purifications resulted in the isolation of compounds **1-3**, **43**, **44**, **75-78** and **80**.

Compound **1** was isolated as an orange amorphous solid which gave a [M+K]⁺ quasimolecular ion peak at *m/z* 459.1228 in the HRMS spectrum consistent with the molecular formula C₂₅H₂₄O₆. The IR spectrum showed bands at 3354 and 1612 cm⁻¹, due to OH and a conjugated carbonyl respectively. The ¹³C and DEPT-135 NMR spectra showed the presence of 21 carbon resonances accounting for one carbonyl, five

oxygenated aromatic quaternaries, seven sp^2 methines, four aromatic quaternaries, one oxygenated methyl and three aliphatic methylenes (Table 9). Detailed analysis of 1D 1H , 2D-COSY and HSQC experiments (Figure 16) showed signals for two 1,4-disubstituted aromatic rings at δ_H 7.05 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.69 (2H, d, $J = 8.3$ Hz) and 7.11 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.66 (2H, d, $J = 8.5$ Hz). Two other spin systems could be observed in COSY, an allyl at 6.23 (1H, br d, $J = 15.6$ Hz), 6.05 (1H, dt, $J = 15.6, 6.3$ Hz) and 3.36 (2H, m) and two methylenes at 3.31 (2H, m) and 2.87 (2H, t, $J = 8.2$ Hz). The HMBC correlations of H-2 with δ_C 156.5 (C-4) and 31.5 (C-7) and of H-7 and H-8 with δ_C 207.1 (C-9) suggested that the first ring was hydroxylated and branched to a chain consisting of two methylenes and a carbonyl. HMBC signals of H-2'' with δ_C 157.4 (C-4'') and 130.3 (C-7'') showed that the second ring was also hydroxylated and branched to the allyl group. The six remaining carbons were assigned to a third aromatic ring substituted by three oxygenated functions and the two phenylpropane groups described above. The exact positions of all the substituents were determined from the HMBC correlations of H-9'' with δ_C 165.1 and 164.0 and the methoxy group with δ_C 165.1. From these data, only two possibilities can be considered for the position of the methoxy group: C-2' or C-4'. Using 1D-selective NOESY experiment, a clear correlation between the methoxy group and H-5' was observed meaning that the methoxy group was branched at C-4'. Examination of the mass spectrum (APCI) revealed a fragment at m/z 301 (Figure 16) thus confirming the proposed structure. Based on the above spectral evidence, **1** was characterized as 4,2',6'-trihydroxy-3'-(4''-hydroxycinnamyl)-4'-methoxydihydrochalcone and named balsacone A.

Compound **2** was isolated as an orange amorphous solid which gave a $[M+K]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 459.1209 in the HRMS spectrum consistent with the molecular formula $C_{25}H_{24}O_6$. The IR spectrum showed bands at 3335 and 1611 cm^{-1} , due to OH and conjugated carbonyl respectively. The ^{13}C and DEPT-135 NMR spectra afforded signals accounting for 21 carbons (one carbonyl, five oxygenated aromatic quaternaries, seven sp^2 methines, four aromatic quaternaries, one oxygenated methyl and three aliphatic methylenes). The 1H and ^{13}C NMR spectra were similar to those of compound **1** suggesting that **2**

was an isomer. Indeed, after detailed analysis of NMR spectra, the only difference was accounted for the position of the methoxy group, which was determined as C-4 by the HMBC correlation at δ_{H} 3.73 (3H, s, OCH₃) and δ_{C} 159.4 (C-4). Compound **2** was thus characterized as 2',4',6'-trihydroxy-3'-(4''-hydroxycinnamyl)-4-methoxydihydrochalcone and named balsacone B.

Compound **3** was isolated as an orange amorphous solid which gave a [M+H]⁺ quasimolecular ion peak at m/z 391.1500 in the HRMS spectrum consistent with the molecular formula C₂₄H₂₂O₅. The IR spectrum showed bands at 3332 and 1611 cm⁻¹, due to OH and conjugated carbonyl respectively. The ¹³C and DEPT-135 NMR spectra afforded signals accounting for 20 carbons (one carbonyl, four oxygenated aromatic quaternaries, eight sp² methines, four aromatic quaternaries and three aliphatic methylenes). Detailed analysis of 1D ¹H, 2D-COSY and HSQC experiments showed signals for one monosubstituted aromatic at δ_{H} 7.23 (2H, m), 7.23 (2H, m) and 7.14 (1H, m) and one 1,4-disubstituted aromatic ring at δ_{H} 7.12 (2H, m) and 6.66 (2H, d, J = 8.5 Hz). The remaining signals were almost identical to those of compound **1** and **2**. Compound **3** was thus characterized as 2',4',6'-trihydroxy-3'-(4''-hydroxycinnamyl)-dihydrochalcone and named balsacone C.

All other isolates were known substances identified as trans-cinnamic acid (**43**) (Kalinowska et al. 2007), trans-4-hydroxycinnamic acid (**44**) (Massow et Smith 1976), 4,2',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**78**) (Zhi-da et al. 1987), 2',4',6'-trihydroxy-4-methoxydihydrochalcone (**77**) (Zhi-da et al. 1987), 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (**75**) (Mustafa et al. 2003), 2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxydihydrochalcone (**76**) (Nilsson 1961) and 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**80**) (Tanaka et al. 1984).

Conserva and coworkers proposed a biosynthetic pathway for similar compounds isolated from *Iryanthera laevis* in 1990 (Conserva et al. 1990). From their results, the biosynthesis of the balsacones A, B and C could be explained by cinnamylation reactions of compounds **78**, **77** and **75** respectively. Indeed, Conserva *et al.* supposed the existence of compound **2** without being able to isolate it.

Antibacterial activity of compounds **1-3**, **43**, **44**, **75-78** and **80** were evaluated against *E. coli* (gram-) and *S. aureus* (gram+). The results presented in Table 10 show that all compounds were inactive against *E. coli*. In contrast, dihydrochalcones **1-3** were found significantly active against *S. aureus* with MIC values of 6.3 μ M, 6.3 μ M and 3.1 μ M, respectively. All other compounds (**43**, **44**, **75-78** and **80**) were inactive with MIC higher than 100 μ M. These results suggest that the presence of the 4-hydroxycinnamyl group at position 3' of ring A of balsacones (**1-3**) is important to obtain significant biological activities. Indeed, compounds **75-78** and **80**, which are missing the 4-hydroxycinnamyl group, are inactive. Hufford and Oguntimein reported also that the presence of an alkyl group in position 3' of dihydrochalcone ring A is essential for antibacterial activity (Hufford et Oguntimein 1982). In addition, Awouafack and coworkers suggested that a prenyl group at the same position is an antibacterial inducer (Awouafack et al. 2010). Surprisingly, their compounds were active against *E. coli*, but not against *S. Aureus* suggesting that the structure of alkyl groups could modulate the selectivity toward gram+ or gram- bacteria. The cytotoxicity of compounds **1-3**, **43**, **44**, **75-78** and **80** was also evaluated on human skin fibroblasts, WS1. The results presented in Table 2 show that compounds **1**, **3**, **75**, **76**, **80** were moderately cytotoxic with IC₅₀ values ranging from 20 to 35 μ M. Interestingly, compound **2** possesses antibacterial properties without cytotoxicity on WS1 cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a FQRNT fonds forestier 02 grant . The authors also wish to thank Marcel Pichette for buds collection, Guillaume Desbiens for extraction and Catherine Dussault for biological evaluation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary data (Experimental details on the isolation of **1-3** and their spectral data) associated with this article can be found on the Internet (Annexe 2).

Table 9: ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR data for balsacones A (**1**), B(**2**) and C (**3**) in CDCl_3

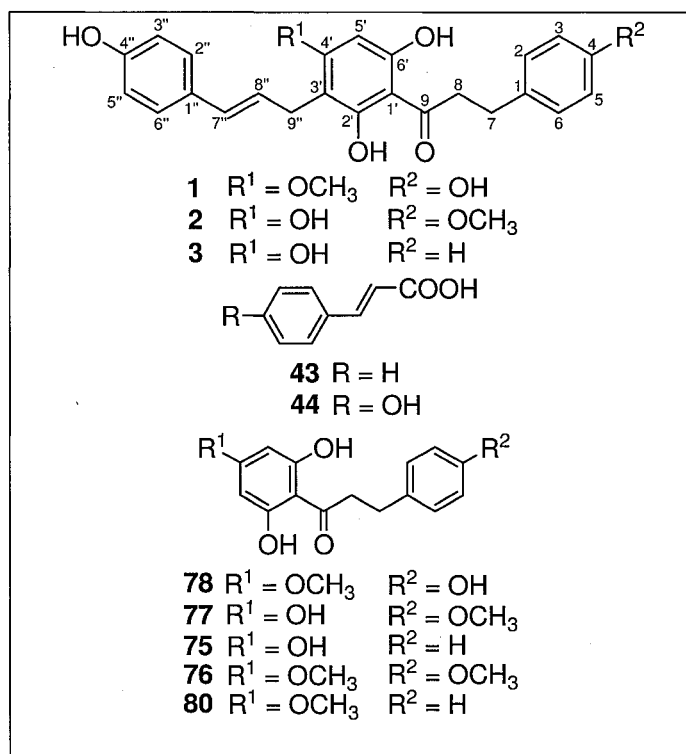
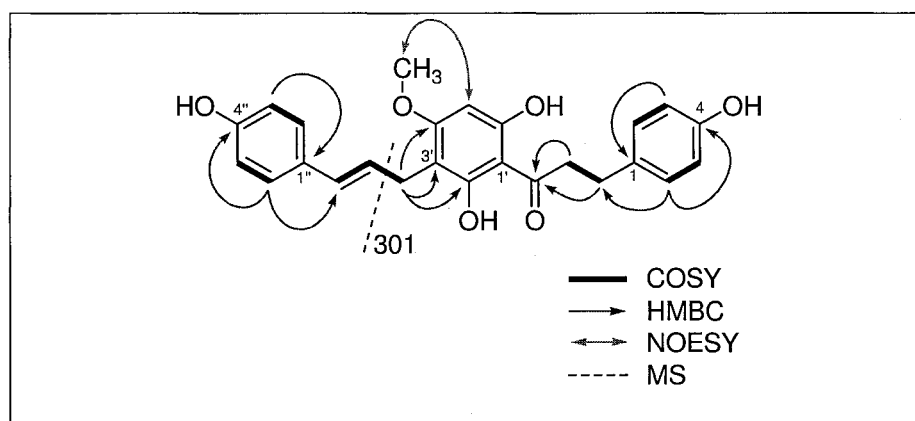
no.	1		2		3	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	134.0 (s)		135.2 (s)		143.3 (s)	
2,6	130.4 (d)	7.05 (2H, d, 8.4)	130.4 (d)	7.13 (2H, d, 8.4)	129.5 (d)	7.23 (2H, m)
3,5	116.2 (d)	6.69 (2H, d, 8.4)	114.8 (d)	6.80 (2H, d, 8.4)	129.4 (d)	7.23 (2H, m)
4	156.5 (s)		159.4 (s)		126.9 (d)	7.14 (1H, m)
7	31.5 (t)	2.86 (2H, m)	31.6 (t)	2.88 (2H, m)	32.4 (t)	2.95 (2H, t, 8.3)
8	47.7 (t)	3.31 (2H, m)	47.4 (t)	3.29 (2H, m)	47.1 (t)	3.33 (2H, m)
9	207.1 (s)		206.4 (s)		206.2 (s)	
1'	105.8 (s)		105.3 (s)		105.3 (s)	
2'	164.0 (s)		165.1 (s)		165.2 (s)	
3'	107.7 (s)		106.7 (s)		106.7 (s)	
4'	165.1 (s)		163.9 (s)		163.9 (s)	
5'	91.2 (d)	6.04 (1H, s)	95.0 (d)	5.94 (1H, br s)	95.0 (d)	5.94 (1H, br s)
6'	162.4 (s)		161.8 (s)		161.8 (s)	
1''	131.2 (s)		131.3 (s)		131.4 (s)	
2'',6''	128.1 (d)	7.11 (2H, d, 8.5)	128.1 (d)	7.12 (2H, d, 8.4)	128.1 (d)	7.12 (2H, m)
3'',5''	116.2 (d)	6.66 (2H, d, 8.5)	116.2 (d)	6.66 (2H, d, 8.4)	116.2 (d)	6.66 (2H, d, 8.5)
4''	157.4 (s)		157.4 (s)		157.4 (s)	
7''	130.3 (d)	6.22 (1H, br d, 15.8)	130.2 (d)	6.26 (1H, br d, 15.7)	130.2 (d)	6.25 (1H, br d, 15.7)
8''	126.6 (d)	6.05 (1H, dt, 15.8, 6.3)	126.8 (d)	6.10 (1H, dt, 15.7, 6.4)	126.8 (d)	6.11 (1H, dt, 15.7, 6.3)
9''	26.4 (t)	3.35 (2H, m)	26.5 (t)	3.36 (2H, m)	26.5 (t)	3.36 (2H, m)
OCH_3	56.1 (q)	3.83 (3H, s)	55.7 (q)	3.73 (3H, s)		

^as: singlet, d: doublet, t: triplet, m, multiplet. ^bData in parentheses refer to coupling constant (Hz)

Table 10: Antibacterial and cytotoxic activities of compounds **1-3**, **43**, **44**, **75-78** and **80**

Compounds	MIC (μM) ^a		IC ₅₀ (μM)
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	WS1
1	> 200	6.3	25 \pm 2
2	> 200	6.3	> 200
3	> 200	3.1	23.6 \pm 0.8
43	> 200	> 200	> 200
44	> 200	> 200	> 200
78	> 200	100	130 \pm 7
77	NT ^b	NT ^b	> 200
75	> 200	100	35.0 \pm 0.3
76	> 200	> 200	23 \pm 1
80	> 200	> 200	20 \pm 1
Gentamicin ^c	0.04	0.02	NT ^b

^aMinimum inhibitory concentration. ^bNot tested. ^cPositive control.

Figure 15: Structure of compounds **1-3**, **43**, **44**, **75-78** and **80**.Figure 16: COSY, HMBC, NOESY and MS key data for identification of compound **1**.

EXPERIMENTAL PART

General Experimental Procedures

IR spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer (neat, thin films, on NaCl plates). NMR spectra were recorded in methanol- d_4 on a Bruker Avance 400 spectrometer (5 mm QNP with Z-gradient probe) operating at 400.13 MHz (^1H) or 100.61 MHz (^{13}C). Chemical shifts were referenced relative to the corresponding residual solvent signals ($\delta_{\text{H/C}}$ 3.31/49.0 ppm, respectively). The accurate mass determination was carried out with an Applied Biosystems QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS system. Analytical HPLC-DAD-MS analyses were performed on an Agilent 1100 series HPLC-DAD-MS system. A Zorbax ODS C18 column (5 μm , 150 \times 4.6 mm) maintained at 25 $^\circ\text{C}$ was used. The flow rate was 1 mL/min. Agilent G1315B diode array detector was used for UV detection. The UV spectra were recorded from 190 to 400 nm. An Agilent mass selective detector (VL model) equipped with an atmospheric chemical ionisation source (APCI) was employed for MS detection. All mass spectra were acquired in the positive ion mode. The full scan mass spectrum was recorded over the range of m/z 100–1000 with the fragmentor at 70 V. Temperature of the drying gas (N_2) was 350 $^\circ\text{C}$ with a gas flow rate of 10 L/min and a nebulizing pressure of 40 psi. The ionisation voltage was 4000 V and the corona current was 15 μA . All preparative HPLC separations were performed on an Agilent 1100 series instrument (Agilent Technologies Canada Inc.) with a Zorbax ODS column C18 (21.2 \times 25 cm; 7 μm) at a flow rate of 16 mL/min. Compounds were detected by UV absorption at 300 nm. For all HPLC procedures, solvent A was H_2O + 0.1 % HCOOH and solvent B was CH_3CN + 0.1 % HCOOH . Unless otherwise indicated, the elution program was as follow: 0-5min, 20% B, 5-30 min, linear gradient from 35% to 60% B, 30-40 min, linear gradient from 60% to 100%. Silica gel 60 (230-400 mesh, Silicycle) was used for column chromatography. The solvents were purchased from EMD. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets (Silicycle). Detection of the phenolic compounds was carried out with NP/PEG reagent (1% diphenylboric acid 2-aminoethylester in methanol and 5% polyethylene glycol in ethanol) and observing under UV light before and after revelation (254 and 365 nm).

Plant material

The buds of *Populus balsamifera* L. were collected at Chicoutimi, Québec, Canada and identified by M. Patrick Nadeau, Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada. A voucher specimen (No. 499678) is kept in the Louis-Marie herbarium of Université Laval, Québec city, Québec, Canada.

Extraction and isolation

Crushed plant material (875 g) was successively extracted with hot EtOH 95% (3 × 1.5 L), EtOH 80% (3 × 1 L) and EtOH 70% (2 × 1 L). The combined extracts were partitioned between *n*-hexane and MeOH. The MeOH extract (284 g) was subjected to column chromatography over silica gel, eluting with CHCl₃:MeOH gradient (40:1 → 5:1) to afford three fractions (F1-F3). Fraction F1 was subjected to silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (95:5) to provide five fractions (F1.1-F1.5). Fraction F1.2 was chromatographed on silica gel with CHCl₃-MeOH (120:1) affording compounds **76** (85 mg) and **80** (66 mg). Fraction F1.5 was submitted to preparative HPLC affording compounds **43** (52 mg) and **78** (26 mg). Fraction F2 was also subjected to preparative HPLC to provide compounds **1** (22 mg), **2** (34 mg), **3** (18 mg), **44** (42 mg), **77** (50 mg) and **75** (25 mg).

Balsacone A (**1**): orange amorphous solid; UV (MeOH) λ_{\max} 194, 208 (sh), 268, 288 nm; IR (film) ν_{\max} 3354, 2925, 1612, 1513, 1446, 1420, 1220, 1138, 1106, 968, 830 cm⁻¹; ¹H NMR and ¹³C NMR, see Table 9; APCIMS (pos.) *m/z* 421 [M-H]⁺ (21), 301 (100); HRMS *m/z* 459.12276 (calcd for C₂₅H₂₄O₆K, 459.12099).

Balsacone B (**2**): orange amorphous solid; UV (MeOH) λ_{\max} 194, 208 (sh), 268, 288 nm; IR (film) ν_{\max} 3335, 2930, 1611, 1512, 1438, 1244, 1176, 1137, 828 cm⁻¹; ¹H NMR and ¹³C NMR, see Table 9; APCIMS (pos.) *m/z* 421 [M-H]⁺ (43), 301 (100); HRMS *m/z* 459.12085 (calcd for C₂₅H₂₄O₆K, 459.12099).

Balsacone C (**3**): orange amorphous solid; UV (MeOH) λ_{\max} 192, 206 (sh), 266, 290 nm; IR (film) ν_{\max} 3332, 2919, 1611, 1512, 1442, 1250, 1217, 1139, 1080, 833 cm⁻¹; ¹H NMR and ¹³C NMR, see Table 9; APCIMS (pos.) *m/z* 391 [M-H]⁺ (36), 271 (100). HRMS *m/z* 391.15000 (calcd for C₂₄H₂₃O₅, 391.15455).

(*E*)-cinnamic acid (**43**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.67 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7), 7.39-7.58 (5H, H-Ar), 6.48 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 170.4 (C-9), 146.3 (C-7), 135.8 (C-1), 131.4 (C-4), 130.0 (C-3/C-5), 129.2 (C-2/C-6), 119.4 (C-8).

(*E*)-4-hydroxycinnamic acid (**44**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.62 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7), 7.47 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2/H-6), 6.82 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3/H-5), 6.31 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 172.6 (C-9), 162.5 (C-4), 148.0 (C-7), 132.5 (C-2/C-6), 128.6 (C-1), 118.2 (C-3/C-5), 117.2 (C-8).

4,2',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**78**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.04 (2H, d, $J=8.1$ Hz, H-2/H-6), 6.69 (2H, d, $J=8.1$ Hz, H-3/H-5), 5.92 (2H, s, H-3'/H-5'), 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.28 (2H, m, H-8), 2.84 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 206.8 (C-9), 167.5 (C-4'), 165.6 (C-2'/C-6'), 156.5 (C-4), 134.0 (C-1), 130.4 (C-2/C-6), 116.1 (C-3/C-5), 106.0 (C-1'), 94.3 (C-3'/C-5'), 55.8 (OCH_3), 47.4 (C-8), 31.4 (C-7).

2',4',6'-trihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**77**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.13 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2/H-6), 6.81 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3/H-5), 5.82 (2H, s, H-3'/H-5'), 3.74 (3H, s, OCH_3), 3.28 (2H, m, H-8), 2.87 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 206.2 (C-9), 166.1 (C-4'), 165.8 (C-2'/C-6'), 159.3 (C-4), 135.1 (C-1), 130.3 (C-2/C-6), 114.7 (C-3/C-5), 105.3 (C-1'), 95.7 (C-3'/C-5'), 55.6 (OCH_3), 47.1 (C-8), 31.3 (C-7).

2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (**75**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.25 (2H, m, H-3/H-5), 7.23 (2H, m, H-2/H-6), 7.14 (1H, m, H-4), 5.82 (2H, s, H-3'/H-5'), 3.32 (2H, m, H-8), 2.94 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 206.1 (C-9), 166.2 (C-4'), 165.9 (C-2'/C-6'), 143.2 (C-1), 129.5 (C-2/C-6), 129.4 (C-3/C-5), 126.9 (C-4), 105.3 (C-1'), 95.8 (C-3'/C-5'), 47.0 (C-8), 32.2 (C-7).

2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxydihydrochalcone (**76**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.12 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2/H-6), 6.80 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3/H-5), 5.91 (2H, s, H-3'/H-5'), 3.75 (3H, s, OCH_3), 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.29 (2H, m, H-8), 2.87 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 206.5 (C-9), 167.4 (C-4'), 165.6 (C-2'/C-6'), 159.3 (C-4), 135.0 (C-1), 130.3 (C-2/C-6), 114.7 (C-3/C-5), 106.0 (C-1'), 94.3 (C-3'/C-5'), 55.8 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 47.2 (C-8), 31.1 (C-7).

2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**80**): ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.23 (4H, m, H-2/H-3/H-5/H-6), 7.15 (1H, m, H-4), 5.92 (2H, s, H-3'/H-5'), 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.33 (2H, m, H-8), 2.94 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 205.6 (C-9), 166.7 (C-4'), 164.8 (C-2'/C-6'), 142.3 (C-1), 128.6 (C-2/C-6), 128.6 (C-3/C-5), 126.1 (C-4), 105.2 (C-1'), 93.5 (C-3'/C-5'), 55.0 (OCH_3), 46.2 (C-8), 31.2 (C-7).

Evaluation of antibacterial activity

Antibacterial activity was evaluated using the microdilution method described by Banfi et al. (Banfi et al. 2003) with some modifications. Briefly, exponentially growing bacteria were plated in 96-well flat bottom microplates (BD Falcon) at a density of 5×10^3 gram-negative *E. coli* (ATCC 25922) or 40×10^3 gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923) per well in 100 μL nutrient broth (Difco). Increasing concentrations of tested compounds in methanol (Sigma-Aldrich) were then added (100 μL per well). The final concentration of methanol in the culture medium was maintained at 0.1% (v/v) to avoid solvent toxicity. The microplates were incubated for 6 h at 37 °C. Absorbance was measured after 6 h on an automated 96-well Varioskan plate reader plate reader (Thermo, Labsystems) using wavelengths of 600 nm for *E. coli* and 660 nm for *S. aureus*. The MIC was determined as the lowest concentration at which no growth was observed.

CHAPITRE 5

BALSACONES D-I, DIHYDROCINNAMOYL FLAVANS FROM *POPULUS BALSAMIFERA* BUDS

François Simard ^a, Jean Legault ^a, Serge Lavoie ^a, André Pichette ^{a,*}

^a Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi (Québec), Canada, G7H 2B1

* Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011; fax: +1 418 545 5012. E-mail address: andre_pichette@uqac.ca (A. Pichette).

(Article à soumis à *Phytochemistry*)

Keywords: *Populus balsamifera* L, *Salicaceae*, bud, flavan, dihydrochalcone, balsacone, chiral separation, circular dichroism, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, computational calculations.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (F. Simard) a rédigé toutes les sections du manuscrit, effectué les travaux de fractionnement et la caractérisation des composés. S. Lavoie a contribué à la caractérisation des composés (analyse RMN, calculs de dichroïsme circulaire) en plus de réviser le manuscrit. J. Legault et A. Pichette sont respectivement les codirecteur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE

Twelve new flavan derivatives consisting of six pairs of enantiomers were isolated and characterized based on their spectroscopic data and their antibacterial activity was evaluated.



RÉSUMÉ

Une étude phytochimique d'un extrait éthanolique de bourgeons de *P. balsamifera* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de douze nouveaux dérivés de flavane sous la forme de six paires d'énantiomères. Les structures des (+) et (-)-balsacones D-I ont été caractérisées grâce à l'analyse des données spectrales (RMN 1D et 2D, IR, spectre de masse) et leur configuration absolue a été établie grâce à une analyse de diffraction de rayon X et à des calculs de spectres de dichroïsme circulaire basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité. L'activité antibactérienne et la cytotoxicité des composés isolés ont été évaluées *in vitro* contre *S. aureus* et des fibroblastes de peau humaine (WS1) respectivement.

ABSTRACT

A phytochemical investigation of an ethanolic extract from *P. balsamifera* L. buds resulted in the isolation and characterization of twelve new flavan derivatives consisting of six pairs of enantiomers. Structures of (+) and (-)-balsacones D-I were elucidated based on spectroscopic data (1D and 2D NMR, MS) and their absolute configuration was established based on X-ray single crystal diffraction analysis and ECD computational calculations. Antibacterial activity and cytotoxicity of all purified enantiomers were evaluated *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and human skin fibroblast cells (WS1) respectively.

INTRODUCTION

The genus *Populus* includes nearly 30 species distributed mostly throughout the northern hemisphere (Dickmann 2001). Buds from several *Populus* species are covered with an exudate (Greenaway et al. 1990b; Eckenwalder 1996) that has attracted a growing interest in the scientific community since it has been identified as a known plant source of propolis (Bankova et al. 2002; Salatino et al. 2011). Propolis is a bee product that has been used in folk medicines around the world for the treatment of wounds and burns, sore throats, stomach ulcers, etc. (Bankova 2005; Salatino et al. 2011). Several studies about propolis have established similarities between the compositions of poplar's buds exudate (PBE) and what is sometimes referred to as poplar type propolis. For example, hydroxycinnamates and their derivatives, which are characteristic constituents of PBE from the entire genus *Populus* (Tsai et al. 2006; Chen et al. 2009), have been identified many times in propolis (Salatino et al. 2011). Other species-specific components of *Populus*, such as dihydrochalcones present in PBE from section *Tacamahaca*, have also been described in propolis (Christov et al. 2006). On the other hand, only a handful of studies about biological and pharmacological properties of PBE are available. Vardar-Ünlü *et al* demonstrated that bud extracts from different *Populus* species possess antibacterial activity similar to that of poplar-type propolis (Vardar-Ünlü et al. 2008). Antioxidant properties were also detected for *Populus nigra* bud extract (Dudonné et al. 2011). Close relations between the chemical compositions of poplar type propolis and PBE suggest that PBE might be an interesting untapped source for the discovery of new bioactive compounds.

The exudate covering buds from *Populus balsamifera* L. (section *Tacamahaca*) has a strong balsam smell in the spring. Amongst other, North American aboriginals used tincture or poultice of *P. balsamifera* buds as dermatological and gastrointestinal aids and for the treatment of chronic rheumatism, (Moermann 1998). Earlier studies revealed that buds are rich in phenolic compounds such as simple phenols and phenolic acids (Pearl et al. 1968c; Mattes et al. 1987; Reichardt et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et al. 2003), phenolic glycosides (Pearl et al. 1968c), hydroxycinnamic acids and their esters (Pearl et al. 1968b; Greenaway et al. 1990b; Greenaway et al. 1992a; Greenaway et al. 1992b;

Isidorov et Vinogorova 2003), flavones and flavanones (Kurkin et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), chalcones and dihydrochalcones (Greenaway et al. 1989; Greenaway et Whatley 1990b; Kurkin et al. 1990; Greenaway et al. 1992a). However, little work has been conducted on their biological and pharmacological potential. Recently, the LASEVE team identified three new hydroxycinnamylated dihydrochalcones from an ethanolic extract of *P. balsamifera* buds (Lavoie et al. 2013). Balsacone A, B and C, were found active against *Staphylococcus aureus* with MIC ranging from 3.1 to 6.3 μ M. Continuing the search for new antibacterial compounds, the ethanol extract of buds from *P. balsamifera* has been further investigated. The isolation and structural elucidation of 12 new flavan derivatives which have been isolated as 6 pairs of enantiomers is reported in the present paper. The antibacterial activity and the cytotoxicity of these compounds were evaluated against *S. aureus* and human skin fibroblast cells respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Structural determination

Fractionation of *P. baslamifera* bud ethanolic extract by liquid-liquid extraction, silica gel column chromatography and reversed phase flash chromatography followed by preparative HPLC purification yielded compounds **149-154** (figure 17).

Balsacone D (**149**) was isolated as a yellow powder and its molecular formula was established as $C_{24}H_{22}O_5$ based on the $[M+Na]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 413.1374 in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3347 and 1615 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and DEPT-135 NMR spectra afforded signals accounting for 20 carbons, i.e. one carbonyl, four oxygenated quaternary aromatic carbons, six sp^2 and one oxygenated sp^3 methines, four aromatic quaternaries and four methylenes. Detail analysis of 1D 1H , 2D-COSY and HSQC experiments (figure 18) showed signals for a 1,4 disubstituted aromatic ring at δ_H 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'/H-6') and 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'/H-5') and a monosubstituted aromatic ring at δ_H 6.91 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2''/H-6''), 7.16 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-3''/H-5'') and 7.10 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4''). Two other spin systems could be observed in COSY, i.e. two methylenes at

δ_{H} 2.84 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, H-7'') and 3.24 (2H, m, H-8'') and a AA'BB'X system at δ_{H} 2.06 (1H, m, H-3a), 2.19 (1H, m, H-3b), 2.68 (1H, m, H-4a), 2.78 (1H, ddd, $J = 17.0, 5.9, 2.4$ Hz, H-4b) and 5.07 (1H, dd, $J = 11.0, 2.0$ Hz, H-2). Also, the presence of a chelated hydroxyl proton was detected based on the signal at δ_{H} 13.82 (1H, s, 7-OH) on the 1D ^1H spectrum. The HMBC correlations of δ_{C} 205.2 (C-9'') with H-7'' and H-8'' and of δ_{C} 31.2 (C-7'') with H-2''/H-6'' suggested that the two methylenes were linked to a ketone and to the monosubstituted aromatic ring resulting in a dihydrocinnamoyl moiety. The HMBC correlations of δ_{C} 158.3 (C-4') with H-3'/H-5' and of δ_{C} 132.7 (C-1') with H-2'/H-6' and H-2 indicated that the 1,4 disubstituted aromatic ring was hydroxylated and branched to the AA'BB'M system. The six remaining carbon signals at δ_{C} 163.2 (C-5), 96.1 (C-6), 166.0 (C-7), 105.7 (C-8), 159.7 (C-9) and 102.0 (C-10) were assigned to a third aromatic ring. This third aromatic ring was also attached to the AA'BB'M spin system as shown by the HMBC correlation of C-5 with H-4a and H-4b which suggested it might be forming the ring A of a flavan skeleton hydroxylated in position 5, 7 and 4'. The proton signal at δ_{H} 6.02 (1H, s, H-6) implied the presence of a penta-substituted ring A to which the dihydrocinnamoyl unit would be attached. The presence of a peak at m/z 271 on the mass spectrum (APCI) representing the fragment obtained by the typical retro Diels-Alder fragmentation reaction of flavonoids (Pelter et al. 1965) confirmed the attachment of the dihydrocinnamoyl moiety to the A ring. A W-coupling between C-9'' and H-6 was also present in the HMBC spectrum. From these observations, only two possibilities can be considered for the position of the dihydrocinnamoyl moiety, i.e. C-6 and C-8. The 2D-NOESY correlations of H-8'' with H-2 and H-2'/H-6' confirmed that the dihydrocinnamoyl moiety was attached at C-8 and therefore the signal at δ_{H} 6.02 could be assigned to H-6. Assignments of positions 5, 7, and 9 were determined using HMBC correlations of C-5 and C-7 with H-6 and of C-5 and C-9 with H-4a and H-4b. The signal at δ_{C} 102.0 was assigned as C-10 based on its HMBC correlations with H-3b and therefore, the signal at δ_{C} 105.7 was assigned as C-8, the only remaining position. Based on the above evidence, balsacone D (**149**) was characterized as 8-(dihydrocinnamoyl)-5,7,4'-trihydroxyflavan.

Balsacone E (**150**) was isolated as a yellow powder and its molecular formula was established as $C_{25}H_{24}O_6$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 421.1656 in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3400 and 1622 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^1H and ^{13}C NMR spectra showed the presence of the same 5,7,4'-trihydroxyflavan skeleton as for compound **149** but with a different substituent at C-8. Analysis of 1D ^1H , 2D-COSY and HSQC experiments showed signals for a 1,4 disubstituted aromatic ring at δ_{H} 6.79 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2''/H-6'') and 6.72 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3''/H-5'') and two methylenes at 2.77 (2H, m, H-7'') and 3.19 (2H, m, H-8''). The HMBC correlations of δ_{C} 205.4 (C-9'') with H-7'' and H-8'' and of δ_{C} 30.3 (C-7'') with H-2''/H-6'' suggested that the two methylenes were linked to a ketone and to the 1,4-disubstituted aromatic ring. The HMBC correlations of δ_{C} 158.7 (C-4'') with H-3''/H-5'' and δ_{H} 3.74 (4''-O-CH₃) established that the 1,4-disubstituted aromatic ring was methoxylated. It was therefore concluded that the C-8 substituent was a 4-methoxydihydrocinnamoyl moiety. The 2D NOESY correlations of H-8'' with δ_{H} 5.08 (1H, dd, $J = 10.7, 2.3$ Hz, H-2) and 7.37 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'/H-6') confirmed that the 4-methoxydihydrocinnamoyl moiety was in C-8. From the above evidence, balsacone E (**150**) was characterized as 8-(4-methoxydihydrocinnamoyl)-5,7,4'-trihydroxyflavan.

Balsacone F (**151**) was isolated as a yellow powder and its molecular formula was established as $C_{25}H_{24}O_6$ based on the $[M+Na]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 443.1477 in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3363 and 1617 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^1H and ^{13}C NMR data were closely related to **150** suggesting that **151** was an isomer. Indeed, after detail analysis of NMR spectra, the only difference was accounted for the position of the methoxy group, which was determined as C-5 by the HMBC correlation of δ_{C} 164.7 (C-5) with δ_{H} 3.89 (3H, s, OCH₃). Based on the above evidence, balsacone F (**151**) was characterized as 8-(4-hydroxydihydrocinnamoyl)-7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavan.

Balsacone G (**152**) was obtained as a yellow powder and its molecular formula was established as $C_{24}H_{22}O_6$ based on the $[M+Na]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 429.1330 in the HRMS spectrum. The IR

spectrum showed bands at 3300 and 1628 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. Details analysis of 1D ^1H , 2D-COSY, HSQC and HMBC showed the presence of a 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan skeleton and a dihydrocinnamoyl moiety. HMBC correlations of δ_{C} 161.8 (C-9) with δ_{H} 4.80 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2) and 5.97 (1H, s, H-8) indicated that position C-8 on the 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan skeleton is protonated. Also, a W-coupling between δ_{C} 205.6 (C-9'') and H-8 was observed on the HMBC spectrum indicating that the dihydrocinnamoyl unit was attached at C-6. Based on the above evidence, balsacone G (**152**) was characterized as 6-(dihydrocinnamoyl)-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan.

Balsacone H (**153**) was obtained as a yellow powder and its molecular formula was established as $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_6$ based on the $[\text{M}+\text{K}]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 445.1055 in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3450 and 1632 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. Details analysis of 1D ^1H , 2D-COSY and HSQC showed the presence of the same 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan skeleton and dihydrocinnamoyl unit as in **152**. However, ^1H NMR and ^{13}C spectra of **153** shows discrepancies from those of **152**. These discrepancies were attributed to the position of attachment of the dihydrocinnamoyl unit which was proposed to be C-8 instead of C-6. The C-8 attachment was confirmed by the HMBC correlations of δ_{C} 158.7 (C-9) with δ_{H} 4.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2) and of δ_{C} 163.3 (C-5) and 166.1 (C-7) with δ_{H} 6.05 (1H, s, H-6). Based on the above evidence, balsacone H (**153**) was characterized as 8-(dihydrocinnamoyl)-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan.

Balsacone I (**154**) was obtained as a yellow powder and its molecular formula was established as $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_7$ based on the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 459.1431 in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3337 and 1614 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were almost identical to those of compound **153** but with an additional methoxy group at δ_{H} 3.74 (3H, s, OCH_3) and δ_{C} 55.3 (OCH_3). This group was assigned at 4'' from the HMBC correlation between δ_{C} 158.7 (C-4'') and the methoxy protons. 2D-NOESY correlations of δ_{H} 7.36 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2'/H-6') with 2.76 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, H-7'') and δ_{H} 3.16 (2H, m, H-8'') further confirmed that the (4-

methoxydihydrocinnamoyl moiety was located at C-8. Based on the above evidence, balsacone I (**154**) was characterized as 8-(4-methoxydihydrocinnamoyl)-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan.

Measurement of the optical rotation of compounds **149-154** yielded $[\alpha]_D$ values of 0. Furthermore, no Cotton Effect (CE) was observed on their ECD spectra suggesting that they were racemic. Chiral analytical HPLC confirmed the presence of two compounds in equal amounts and chiral semi-preparative HPLC purification yielded the (+) and (-) enantiomers for the six racemic mixtures (**149-154**). Crystals of (-)-**149** were obtained after drying an IPA solution under a N₂ stream. Single-crystal X-ray diffraction analysis allowed to determine that the C-2 absolute configuration of (-)-**149** was *S* (figure 19). Absolute configuration of other purified enantiomers was determined by comparing their experimental ECD spectra with the calculated ones obtained using the time dependent density functional theory (TDDFT) method (figure 20). Comparison of the experimental ECD spectrum of (-)-**149** with calculated ECD spectrum of (2*S*)-**149** (figure 20) further confirmed its 2*S* absolute configuration. Indeed, the calculated ECD spectrum showed a positive CE at 214 nm and two negative CEs at 238 and 271 nm which were in good agreement with the experimental spectrum (figure 20). It is interesting to note that X-ray diffraction analysis (figure 19) and conformational calculations both showed that the pyran ring of (-)-**149** had a half-chair conformation with *P*-helicity. The negative ¹L_b band CE (288 nm) observed on the experimental ECD spectrum of (-)-**149** was therefore consistent with the helicity rule established for the chroman chromophore (Slade et al. 2005; Kurtán et al. 2012). Experimental ECD spectrum of (+)-**149** showed CEs of opposite signs, i.e. one negative at 227 nm and two positive at 239 and 288 nm, thus confirming its 2*R* absolute configuration. In the case of (-)-**150** and (-)-**151**, the positive CE at 224 nm and the two negative CEs at 239 and 289 nm, observed on their experimental ECD spectra, correlated well with the calculated ECD spectra of 2*S*-**150** and 2*S*-**151** respectively (figure 20). Absolute configurations of (+)-**150** and (+)-**151** were determined to be 2*R* based on the negative and the two positive CEs observed on both ECD spectra at 224, 239 and 289 nm respectively. For compound **152**, a relative *trans* 2,3 configuration with the hydroxyphenyl and the hydroxyl in axial position of the half

chair pyran ring was established based on the $J_{2,3}$ coupling constant of 7.5 Hz observed on its ^1H NMR spectra. Compound (+)-**152** was assigned to the $2R,3S$ absolute configuration since its ECD spectrum was well correlated with the calculated ECD spectrum of $(2R,3S)$ -**152**. The experimental ECD spectrum of (-)-**152** was the opposite to that of (+)-**152** and the absolute stereochemistry of (-)-**152** was therefore determined to be $2S,3R$. In this case, the results obtained from ECD calculations conducted for $2R,3S$ -**152** indicated that the helicity rule established for flavan-3-ols (Slade et al. 2005) is not applicable for the determination of the absolute configuration of compound **152**. The $J_{2,3}$ coupling constant of 8.4 Hz observed in ^1H NMR spectra of **153** and **154** also indicated a $2,3$ -*trans* relative configuration. Absolute configurations of (-)-**153** and (-)-**154** were established as $2R,3S$ based on the good agreement of their respective experimental ECD spectra with calculated ECD spectra for $(2R,3S)$ -**153** and $(2R,2S)$ -**154** (figure 20). The experimental ECD spectra of (+)-**153** and (+)-**154** showed CEs of opposite sign to those present in spectra of (-)-**153** and (-)-**154** indicating a $2S,3R$ absolute configuration.

Proposed biosynthetic pathway

Recently, it was proposed that the biosynthesis of balsacones A (**1**), B (**2**) and C (**3**) proceeded by cinnamylation of dihydrochalcones **78**, **77** and **75** respectively (figure 21), which were also identified in *P. balsamifera* buds ethanolic extract (Lavoie et al. 2013). The presence of compounds **1-3** in the extract and the fact that compounds **149-154** were isolated as racemic mixtures suggested that **149-154** might be artifacts from the extraction process which was conducted under EtOH reflux. Indeed, the presence of **149-154** could be the result of an intramolecular addition of the phenol function in 2' or 4' on the alkene of **1**, **2** or **3**. To rule out this possibility, buds were extracted in cold EtOH for a shorter period of time. The resulting extract was submitted to fractionation using reversed phase flash chromatography. The resulting fractions were analyzed using HPLC-MS-SIM selecting ions at m/z 301, 391, 407, 421 and 437. As shown in fig. 22, the presence of **149-154** could be confirmed in fraction II. This result suggest that **149-154** originated rather from the buds.

A potential biosynthetic pathway for racemic mixtures **149**, **150** and **151** could consist of a non-stereospecific cyclization between C-2'-OH and C-7'' in compounds **3**, **2** and **1** respectively (figure 21). Formation of racemic mixtures **153** and **154** could then be explained by a trans-hydroxylation in position 3 of racemic mixtures **149** and **150** respectively. Additionally, non-stereospecific intramolecular cyclization between C-4'-OH and C-7'' in compound **1** followed by a trans-hydroxylation in position 3 would explain the formation of racemic mixture **152** (figure 21). Recently, a pair of flavonol racemates and a flavonol racemic mixture having similar structures to compounds **149-154** were isolated from chinese propolis (Sha et al. 2009). The fact that they also appear as racemic mixtures in the propolis extract suggests that their biosynthesis might be related to that of compounds **149-154**.

Antibacterial activity and cytotoxicity of enantiomers pairs from **149-154**

Antibacterial activity of pairs of enantiomers **149-154** was evaluated against *S. aureus* after 24 hours of incubation and the results were expressed as minimal inhibitory concentration (MIC). Chloramphenicol and gentamycin were used as positive controls and showed MIC of 0.94 and 0.02 μM respectively. The results presented in Table 3 show that compounds (-)-**149** and (+)-**149** possess higher activity than the other pairs of enantiomers tested (**150-154**), with a MIC of 6.25 μM for both compounds. No difference was observed between the activity of the (+) and the (-) enantiomers for the six pairs evaluated. Compounds (-)-**152**, (+)-**152**, (-)-**153**, (+)-**153**, (-)-**154** and (+)-**154** were found active with MIC ranging from 25 to 50 μM while compounds (-)-**150**, (+)-**150**, (-)-**151** and (+)-**151** were inactive at a concentration of 50 μM . These results suggest that an hydroxyl group at position 4 (compounds (-)-**153** and (+)-**153**) or a methoxy group at position 4'' (compounds (-)-**150** and (+)-**150**) decrease antibacterial activity. Previously reported antibacterial activity of balsacones A (**1**), B (**2**) and C (**3**) on the same *S. aureus* strain (MIC ranging between 3.1 and 6.3 μM) (Lavoie et al. 2013) are similar to the activities obtained for compounds (-)-**149** and (+)-**149**. Finally, purified enantiomers cytotoxicity was evaluated on human skin

fibroblasts WS1. Etoposide was used as a positive control ($IC_{50} = 23 \pm 3$). All compounds were not cytotoxic at a concentration of 50 μ M.

CONCLUDING REMARKS

Isolation of racemic mixtures from plant extracts is rather uncommon (Finefield et al. 2012). In this work, 6 new compounds were isolated as racemic mixtures from an ethanolic extract of buds from *P. balsamifera*. Chiral HPLC allowed the separation of these mixtures to obtain 12 new flavan derivatives consisting of 6 pairs of enantiomers. Since it is rather exceptional to be able to obtain both enantiomers of closely related chiral compounds, the 12 new balsacones constitute a unique library of compounds. This library can be especially useful to study relations between chiral structures and their spectral data. ECD spectroscopy, for example, can be used to establish useful rules for the determination of the absolute configuration of the chroman ring in natural products. The library also contains compounds having toxicity towards *S. aureus* bacteria with MIC ranging between 6.25 and 50 μ M. Further *in vitro* study of the antibacterial activity of the compounds of the library is in progress in the LASEVE laboratory to establish a clearer relation between the structures and absolute configuration of the isolated compounds and their antibacterial activity.

EXPERIMENTAL

General

Melting point was measured with a Mettler Toledo MP70 melting point system (60-350°C, 5°C/min, uncorr.). Optical rotations were obtained at the sodium D line (589 nm) on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. Absorption UV-Vis spectra were recorded using an Agilent 8453 diode-array spectrophotometer while ECD spectra were measured on a Jasco J-815 ECD spectrometer. FTIR spectra were recorded on a Perkin-Elmer SpectrumOne (neat, thin films on NaCl plates). The 1D and 2D NMR spectra (1H - 1H COSY, NOESY, HSQC and HMBC) were performed using an Avance 400 Bruker spectrometer (400.13 MHz for 1H , 100.61 MHz for ^{13}C spectra) equipped with a 5 mm QNP probe. All spectra were

acquired in acetone- d_6 and chemical shifts were reported in ppm (δ) relative to TMS. High resolution electrospray ionisation mass spectra were recorded on an Agilent Technology 6210 TOF MS system. APCI MS (positive mode) spectrum were obtained with an Agilent 1100 series HPLC equipped with an Agilent G1946 VL Mass Selective Detector in positive mode at 70 eV. The column used for HPLC-APCI MS analysis was an Inerstil Prep ODS column (6×250 mm, $10 \mu\text{m}$) at a flow rate of 1 ml/min. HPLC-MS-SIM analysis were conducted using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$) selecting ions at m/z 301, 391, 407, 421 and 437 at a flow rate of 1 ml/min on the same instrument. Semi-preparative HPLC was carried out on an Agilent 1100 HPLC series with an Inerstil Prep ODS column (20×250 mm, $10 \mu\text{m}$) at a flow rate of 10 ml/min and Chiral semi-preparative HPLC with a tris-(3,5-dimethylphenyl)carbamoyl amylose chiral coated column (RegisPackTM, 10×250 mm, $5 \mu\text{m}$) at a flow rate of 4 ml/min. Reversed phase flash chromatography was conducted on a Biotage Flash+ system using a C18 40iM cartridge (carbon loading 17 %, 135 g) from Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Reagents and analytical grade solvents were purchased from VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada) and were used as received. Ultra pure Silica gel ($40\text{-}63 \mu\text{m}$) and glass TLC plates ($40\text{-}63 \mu\text{m}$ with F_{254} indicator) were supplied by Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada).

Plant material

Buds from different trees of *P. balsamifera* were collected in March 2005 in the Chicoutimi region, Québec, Canada. The plant was authenticated by Mr. Patrick Nadeau (Université du Québec à Chicoutimi) and a voucher specimen (No. 499678) was deposited at the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec City, Québec, Canada. After collection, buds were kept frozen until extraction.

Extraction and isolation

Buds previously immersed in liquid nitrogen were coarsely ground using an electrical blender. The resulting crude powder (1036 g) was extracted 5 times (5 h each time) with 2.5 L of 95 % EtOH under reflux

and extracts were combined. After evaporation of the solvent using a rotary evaporator, the residue was suspended in MeOH and washed with hexanes. The dried MeOH residue (380.4 g) was suspended in Et₂O and treated with water. The dried Et₂O phase (355.1 g) was submitted to three successive fractionation steps: (1) silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 40:1, 20:1, 10:1, 0:1); (2) silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 0:1); (3) C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 65:35, 70:30, 72:28, 0:100). The third fractionation step afforded 5 fractions (A-E). Fraction A (19.3 g) was suspended in a CHCl₃-EtOAc mixture (10:1, 100 ml) and filtrated. The filtrate was recovered, dried, and the residue (5.7 g) was submitted to silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, followed by MeOH) to afford 9 subfractions (A1 to A9). A1 (261.2 mg) was purified by semi-preparative HPLC (CH₃CN-H₂O, 50:50) to yield racemic mixture **149** (T_R = 33.3 min, 58.3 mg) which was purified by chiral semi-preparative HPLC (Hexane-IPA, 92:8) to afford (-)-**149** (T_R = 21.9 min, 15.9 mg) and (+)-**149** (T_R = 23.2 min, 18.5 mg). A2 (152.5 mg) was submitted to semi-preparative HPLC (CH₃CN-H₂O, 50:50) to obtain racemic mixture **150** (T_R = 31.2 min, 18.3 mg) which was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 92:8) to afford (-)-**150** (T_R = 25.9 min, 8.6 mg) and (+)-**150** (T_R = 28.7 min, 6.1 mg). A3 (119.7 mg) was applied to a semi-preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20 → 100:0, 30 min.) to yield racemic mixture **151** (T_R = 15.9 min, 30.0 mg) which was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 90:10) to obtain (-)-**151** (T_R = 26.7 min, 6.5 mg) and (+)-**151** (T_R = 29.1 min, 6.1 mg). A4 (545.0 mg) was subjected to two semi-preparative HPLC purification steps [(1) MeOH-H₂O, 75:25; (2) CH₃CN-H₂O, 50:50] to obtain racemic mixture **152** (T_R = 22.8 min, 15.2 mg) which was submitted to chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 85:15) to yield (-)-**152** (T_R = 32.5 min, 3.4 mg) and (+)-**152** (T_R = 40.7 min, 2.5 mg). A7 (244.9 mg) was subjected to semi-preparative HPLC (MeOH-H₂O, 60:40) to obtain racemic mixture **153** (T_R = 44.5 min, 32.0 mg) which was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 90:10) to afford (-)-**153** (T_R = 25.8 min, 12.2 mg) and (+)-**153** (T_R = 30.0 min, 12.6 mg). Fractions A8 (90.1 mg) and A9 (118.9 mg) were both subjected to semi-preparative HPLC (CH₃CN-H₂O, 40:60) and further purified by another semi-preparative HPLC (MeOH-H₂O, 65:35) to obtain racemic mixture **154** (T_R = 25.6 min, 11.2 mg) which was further purified

by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 85:15) to yield (-)-**154** ($T_R = 13.0$ min, 1.5 mg) and (+)-**154** ($T_R = 15.7$ min, 1.2 mg).

Detection of compounds **149-154** in a cold solvent extract

Buds previously immersed in liquid nitrogen were coarsely ground using an electrical blender. The resulting crude powder (25.0 g) was extracted three times (30 min each time) with a total of 150 ml of EtOH on a reciprocal shaker at room temperature. Extracts were combined and evaporated to dryness (2.3 g). Part of the dry residue (500 mg) was submitted to reversed phase flash chromatography (MeOH-H₂O, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0) yielding 7 fractions (I-VII). Fraction II (97.5 mg) was submitted to HPLC-MS-SIM analysis.

Physical data of new compounds

(-)-balsacone D [(-)-**149**]: Yellow powder; mp 186-188; $[\alpha]_D^{22} -17.4$ (c 0.25, Me₂CO); ECD (c 1.3×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{227} = +4.0$, $\Delta\epsilon_{239} = -2.0$, $\Delta\epsilon_{288} = -2.6$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 210 (4.2), 293 (4.1), 330 (3.5); IR ν_{max} 3347, 1615, 1517, 1424, 1372, 1337, 1220, 1145, 1085, 988, 956, 899, 831, 699 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 391 [M+H]⁺ (100), 271 (60); HRESIMS: m/z 413.1374 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₄H₂₂O₅Na⁺, 413.1359)

(+)-balsacone D [(+)-**149**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{21} +15.5$ (c 0.16, Me₂CO), ECD (c 1.3×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{227} = -1.1$, $\Delta\epsilon_{239} = +1.8$, $\Delta\epsilon_{288} = +2.4$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (-)-**149**.

(-)-balsacone E [(-)-**150**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{22} -9.8$ (c 0.1, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{224} = +3.8$, $\Delta\epsilon_{239} = -1.6$, $\Delta\epsilon_{289} = -1.9$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 206 (4.1), 292 (3.9), 330 (3.3); IR ν_{max} 3400, 1622, 1512, 1440, 1424, 1373, 1243, 1220, 1147, 1086, 1030, 989, 955, 897, 827, 678, 598, 569, 535 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 421 [M+H]⁺ (100), 301 (42); HRESIMS: m/z 421.1656 [M+H]⁺ (calcd for C₂₅H₂₅O₆⁺, 421.1646).

(+)-balsacone E [(+)-**150**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{22} +13.4$ (c 0.09, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{224} = -2.6$, $\Delta\epsilon_{239} = +2.4$, $\Delta\epsilon_{289} = +2.7$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (-)-**150**.

(-)-balsacone F [(-)-**151**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{21} -10.0$ (c 0.09, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{227} = +5.0$, $\Delta\epsilon_{239} = -1.3$, $\Delta\epsilon_{289} = -1.1$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 224 (4.4), 287 (4.2), 327 (3.4); IR ν_{max} 3364, 2922, 2851, 1701, 1618, 1589, 1516, 1443, 1372, 1215, 1143, 1113, 1001, 969, 849, 831, 700, 613, 596, 569, 540 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 421 [M+H]⁺ (100), 301 (89); HRESIMS: m/z 443.1477 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₅H₂₄O₆Na⁺, 443.1465).

(+)-balsacone F [(+)-**151**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{23} +12.1$ (c 0.09, Me₂CO); ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{227} = -2.0$, $\Delta\epsilon_{239} = +2.0$, $\Delta\epsilon_{289} = +1.6$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (-)-**151**.

(-)-balsacone G [(-)-**152**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{22} -43.5$ (c 0.03, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{225} = +3.7$, $\Delta\epsilon_{238} = +3.0$, $\Delta\epsilon_{290} = -3.8$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 210 (4.6), 290 (4.6), 327 (3.7); IR ν_{max} 3300, 2923, 1698, 1628, 1599, 1517, 1430, 1368, 1246, 1146, 1089, 988, 921, 832, 750, 700, 560, 522 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 407 [M+H]⁺ (100), 271 (5); HRESIMS: m/z 429.1330 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₄H₂₂O₆Na⁺, 429.1309).

(+)-balsacone G [(+)-**152**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{23} +66.2$ (c 0.03, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{225} = -3.6$, $\Delta\epsilon_{238} = -3.8$, $\Delta\epsilon_{290} = +4.9$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (-)-**152**.

(-)-Balsacone H [(-)-**153**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{25} -38.2$ (c 0.2, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{226} = +3.2$, $\Delta\epsilon_{230} = +2.7$, $\Delta\epsilon_{239} = -0.4$, $\Delta\epsilon_{287} = -4.0$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 226 (4.4), 291 (4.2), 327 (3.6); IR ν_{max} 3450, 2091, 1632, 1518, 1497, 1450, 1429, 1378, 1223, 1147, 1062 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 407 [M+H]⁺ (100), 271 (46); HRESIMS: m/z 445.1055 [M+K]⁺ (calcd for C₂₄H₂₂O₆K⁺, 445.1048).

(+)-balsacone H [(+)-**153**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{25} +36.9$ (c 0.2, Me₂CO), ECD (c 1.2×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{226} = -2.2$, $\Delta\epsilon_{230} = -2.6$, $\Delta\epsilon_{239} = +0.9$, $\Delta\epsilon_{287} = +4.7$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (-)-**153**.

(-)-balsacone I [(-)-**154**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{25}$ -16.2 (c 0.02, Me₂CO), ECD (c 0.57×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{226} = +2.7$, $\Delta\epsilon_{240} = -0.6$, $\Delta\epsilon_{288} = -2.3$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 217 (4.4), 291 (4.3), 325 (3.8); IR ν_{max} 3337, 2924, 1614, 1512, 1425, 1373, 1223, 1177, 147, 1103, 1060, 1031, 971, 933, 829 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 11 and 12; APCIMS: m/z 437 [M+H]⁺ (100), 301 (56); HRESIMS: m/z 459.1431 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₅H₂₄O₇Na⁺, 459.1414).

(+)-balsacone I [(+)-**154**]: Yellow powder; $[\alpha]_D^{25}$ +35.0 (c 0.02, Me₂CO), ECD (c 0.57×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{226} = -2.6$, $\Delta\epsilon_{240} = +1.69$, $\Delta\epsilon_{288} = +4.1$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS data were the same as (-)-**154**; HRESIMS: m/z 437.1586 [M+H]⁺ (calcd for C₂₅H₂₅O₇⁺, 437.1595).

X-ray crystal structure analysis of (-)-balsacone D [(-)-**149**]

Diffraction intensity data were collected by a Bruker smart diffractometer equipped with an APEX II CCD detector employing graphite monochromated Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178$ Å) at 100 K. Crystal data were: C₂₄H₂₂O₅, M = 390.42, monoclinic, space group P2₁, a = 8.42583(14) Å, b = 24.2381(4) Å, c = 9.38693(15) Å, $\beta = 104.9617(9)^\circ$, V = 1852.05(5) Å³, Z = 4, $\rho = 1.400$ g/cm³, $\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.797$ mm⁻¹, total reflections 104988, independent reflections 7175 (R_{int} 0.038 %), final R indices [$I > 2\sigma(I)$] R1 = 0.0351, wR2 = 0.0943, absolute structure parameter = 0.03 (11). The structure was solved by direct methods SHELXS-97 (Sheldrick 2008) and refined with full-matrix least-squares calculations on F² using SHELX-97 (Sheldrick 2008). Crystallographic data for compound (-)-**149** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center (Deposition No. CDCC 919719). Copies of these data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html or from the Cambridge Crystallographic Data Center, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. (fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Conformational analysis, geometrical optimization and ECD calculation

Conformational distributions for **149-154** were obtained through stochastic Monte Carlo guided conformational searches at the molecular mechanics (MMFF) level of theory using the Spartan'10 V1.1.0 software package (Wavefunction Inc.). These conformers were subjected to geometry optimizations by the

density functional theory (DFT) method at B3LYP/ 6-31G(d) level on the Gaussian 09 software (Frisch et al. 2010). Selected optimized conformers (> 5 % of Boltzmann distribution) were then subjected to the TDDFT calculation on Gaussian 09 for 40 excited states at B3LYP/6-311G(2d,2p) level. MeOH solvent effects were taken into account using PCM model. Excitation energy (in nm) and rotatory strength in (velocity form in 10^{40} erg-esu-cm/Gauss) were thus obtained for the different states. The ECD spectra were simulated from these data by normalization, Boltzmann averaging and overlapping Gaussian functions for each transition according to:

$$\Delta\varepsilon(E) = \frac{1}{2.297 \times 10^{-39}} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \sum_i^A \Delta E_i R_i e^{-[(E-\Delta E_i)/(2\sigma)]^2}$$

where σ is the width of the band at 1/e height and ΔE_i and R_i are the excitation energies and rotatory strengths for transition i , respectively. $\sigma = 0.15$ eV and R^{vel} have been used in this work.

Antibacterial activity

Antibacterial activity against *S. aureus* was evaluated using the microdilution method as reported previously (Banfi et al. 2003; Lavoie et al.),. The lowest concentration at which no growth was observed after 24 h of incubation was defined as the minimum inhibitory concentration (MIC). Gentamycin and Chloramphenicol were used as positive controls.

Cytotoxicity

Cytotoxicity was evaluated against human fibroblast cell line WS1 using the resazurin reduction test reported previously (O'Brien et al. 2000; Bellila et al. 2011). Cytotoxicity was expressed as the concentration inhibiting 50 % of cell growth (IC_{50}). Etoposide was used as a positive control.

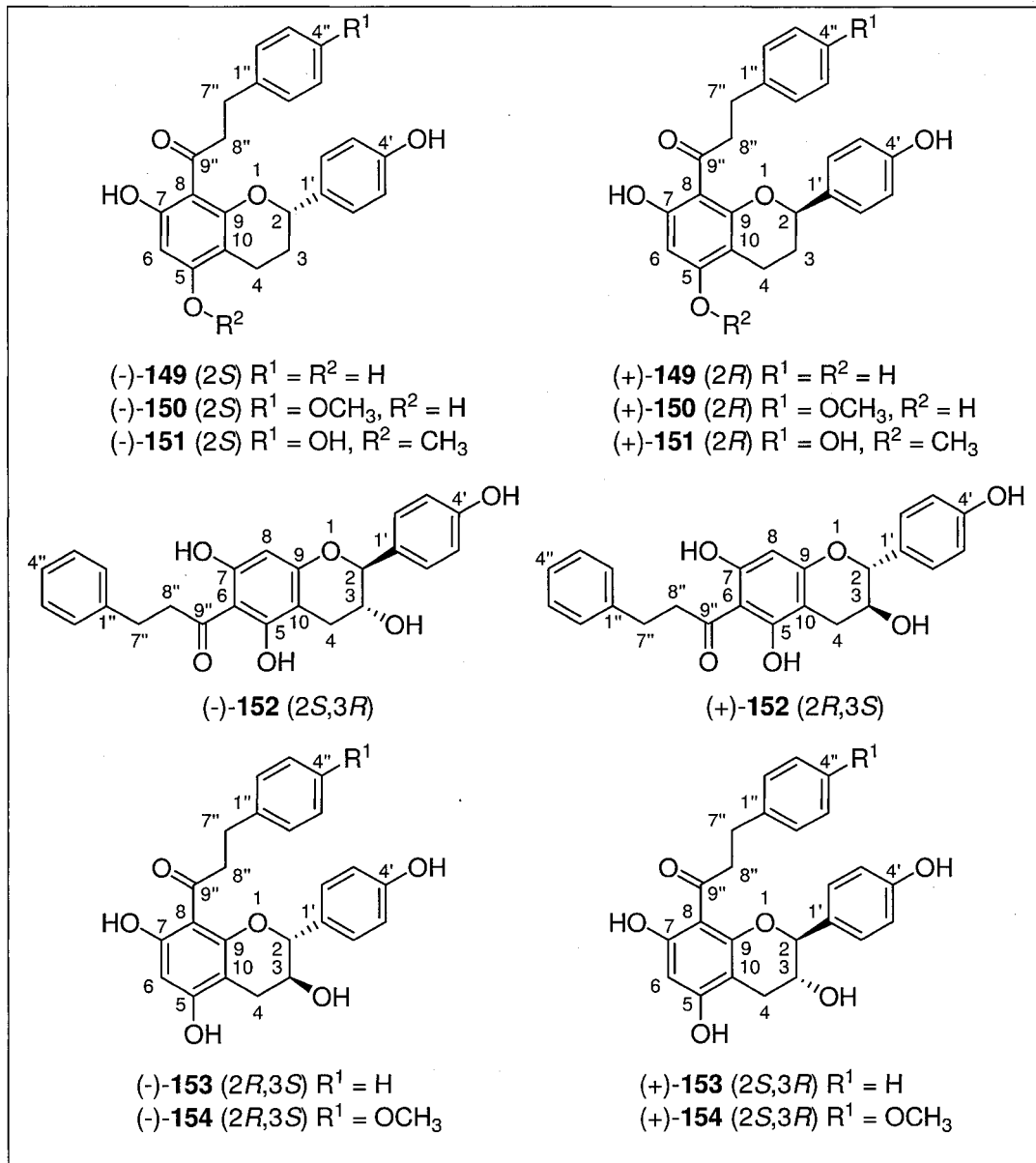
ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a FQRNT fonds forestier O2 Grant, NSERC (doctoral scholarship to FS) and by Fonds de recherche nature et technologies (doctoral scholarship to FS). This research has been

enabled by the use of computing resources provided by WestGrid and Compute/Calcul Canada. The authors would like to thank F. Otis and N. Voyer from PROTEO and Université Laval for their help in recording circular dichroism spectra and C. Dusseault for its technical assistance in the evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article (^1H and ^{13}C NMR spectra) can be found, in the online version (annexe 2).

Figure 17: Structures of **149-154**

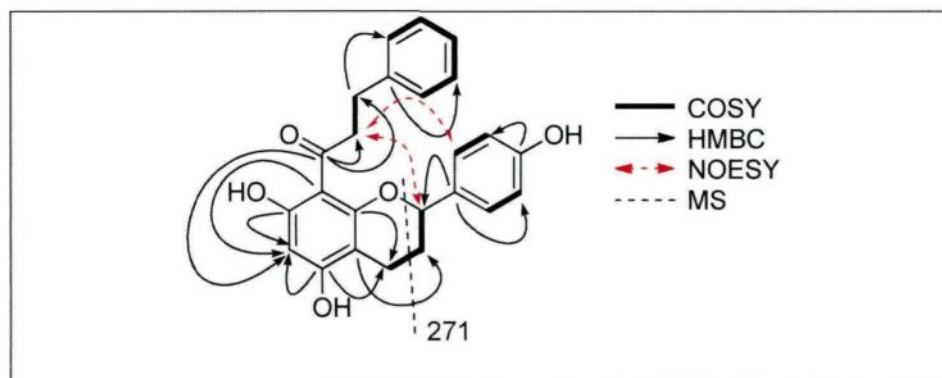


Figure 18: HMBC, COSY, NOESY and MS key data for identification of compound **149**.

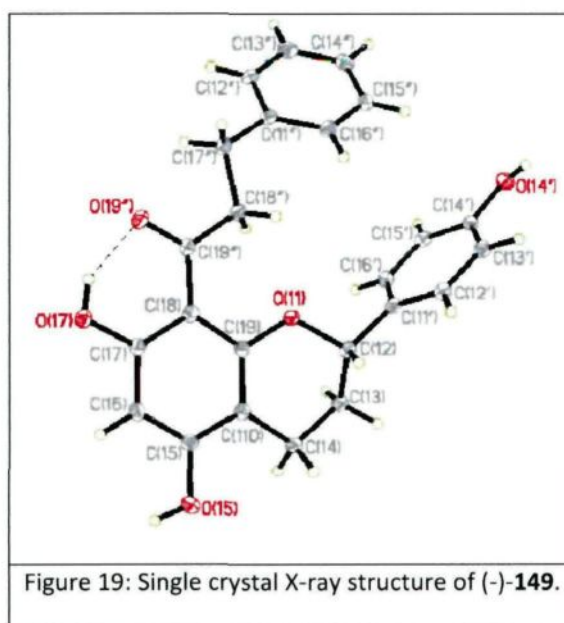


Figure 19: Single crystal X-ray structure of (-)-**149**.

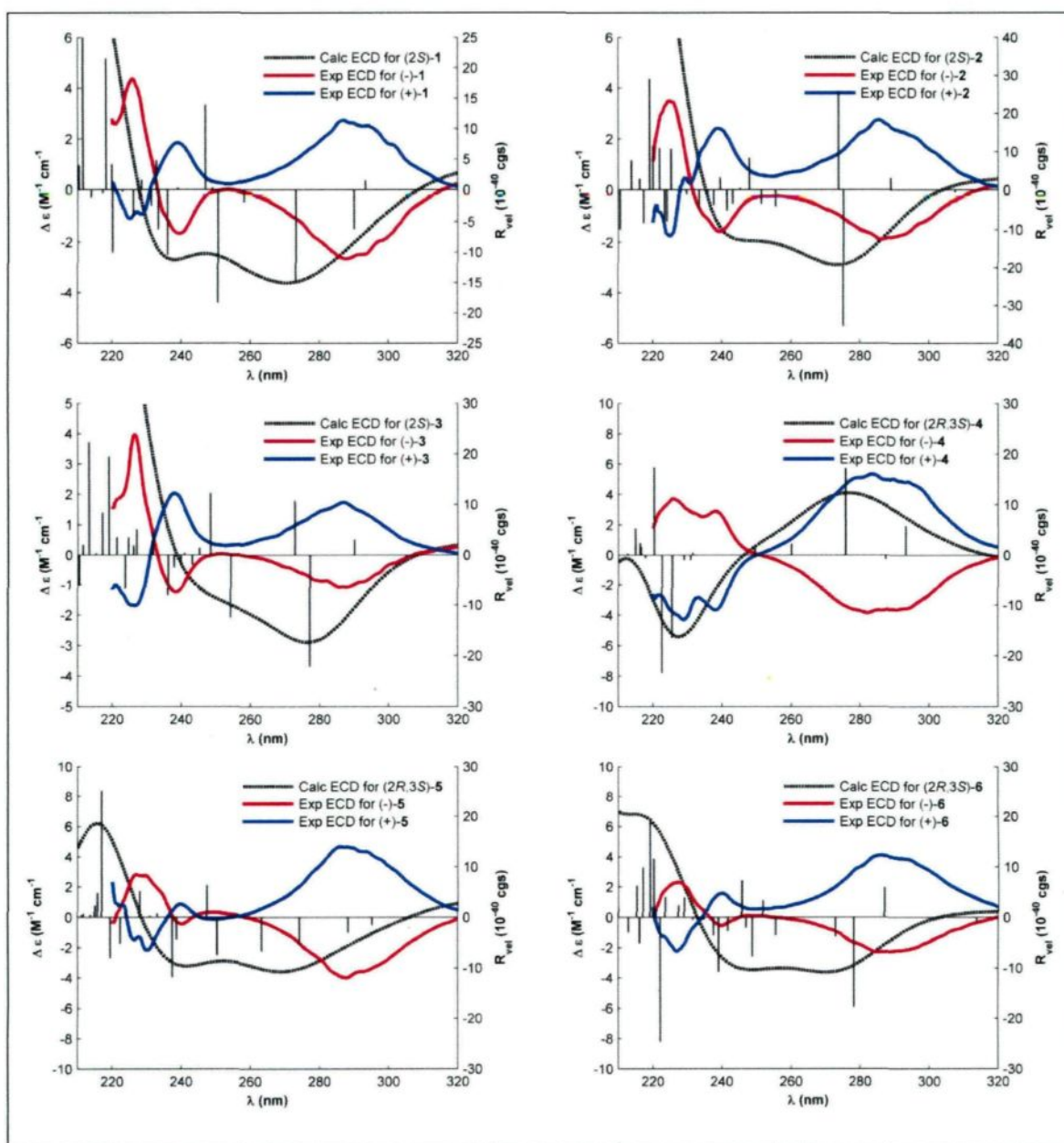


Figure 20: Experimental ECD spectra for compounds **149-154** and calculated (TDDFT at the B3LYP/6-311G(2d,2p) level) EDC spectra of compounds (2S)-**149**, (2S)-**150**, (2S)-**151**, (2R,3S)-**152**, (2R,3S)-**153** and (2R,3S)-**154**.

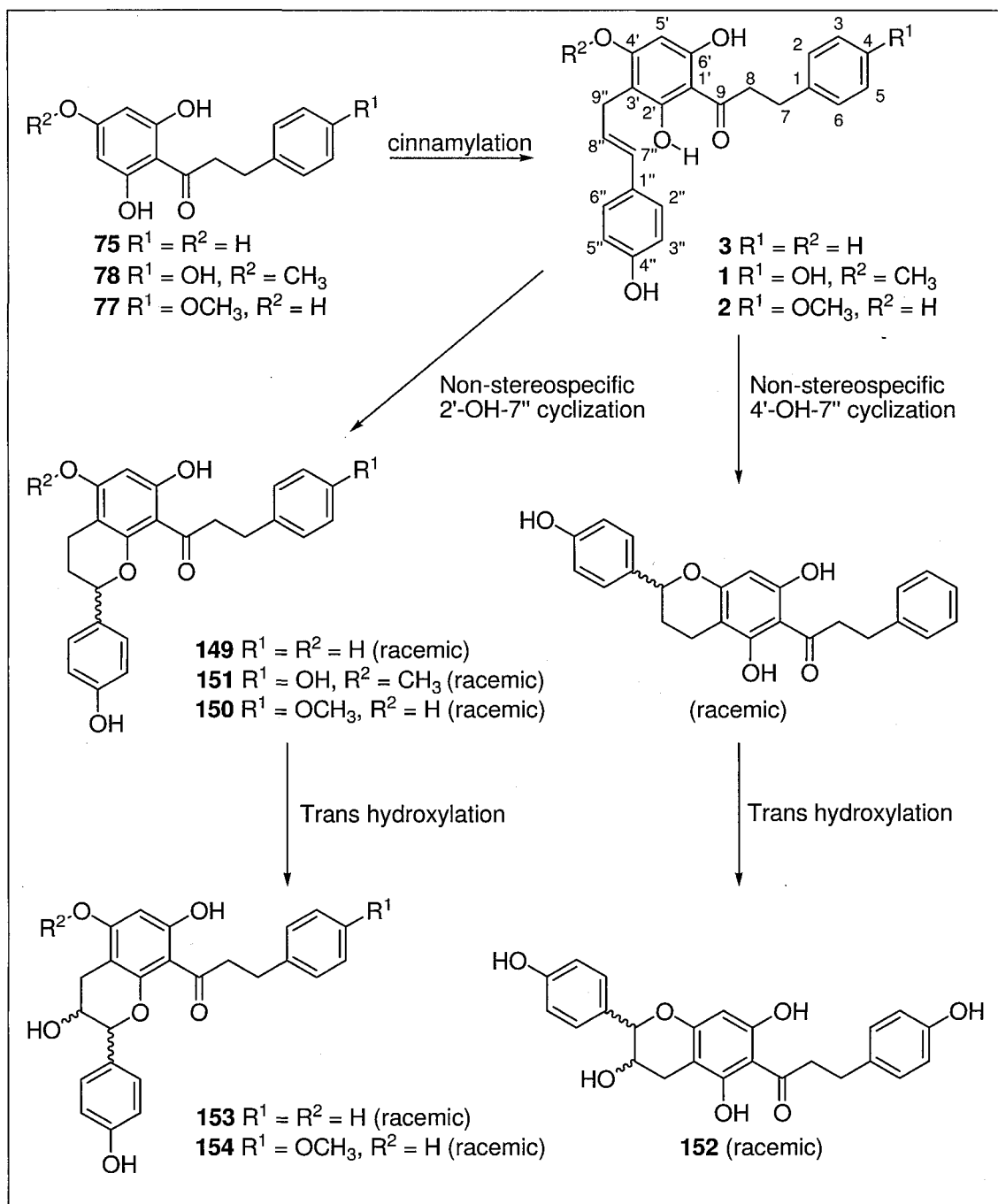


Figure 21: Proposed biosynthetic pathway

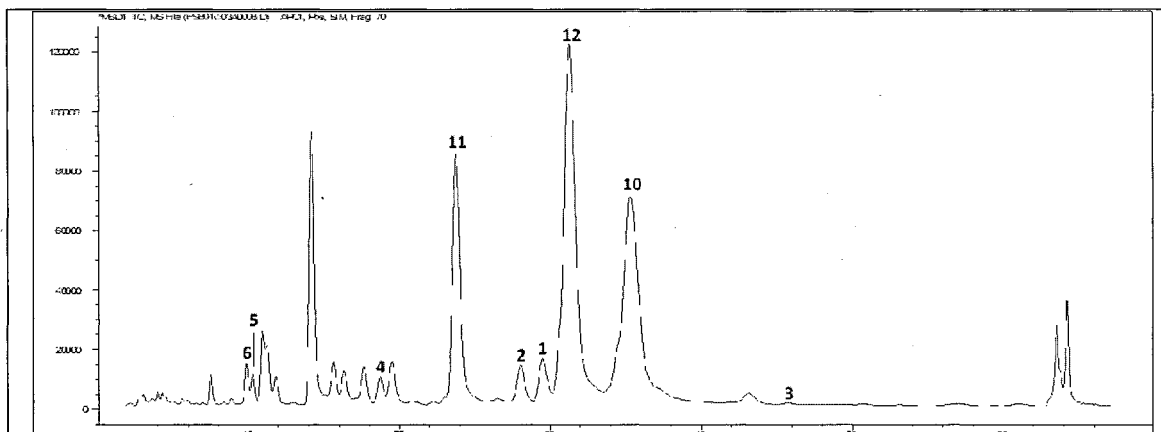


Figure 22: HPLC-MS-SIM chromatogram trace of fraction II obtained from a cold solvent extract.

Table 11: ^1H NMR spectroscopic data of compounds **149** to **154** in acetone- d_6 (400 MHz)

No.	δ_{H} (J in Hz)					
	(\pm)- 149	(\pm)- 150	(\pm)- 151	(\pm)- 152	(\pm)- 153	(\pm)- 154
2	5.07, dd (11.0, 2.0)	5.08, dd (10.7, 2.3)	5.06, dd (10.8, 2.1)	4.80, d (7.5)	4.81, d (8.4)	4.79, d (8.4)
3a	2.06, m	2.11, m	2.06, m	4.09, td (7.0, 5.5)	4.15, td (8.8, 5.9)	4.15, td (8.8, 5.8)
3b	2.19, m	2.19, m	2.19, m	-	-	-
4a	2.68, m	2.70, m	2.66, m	2.55, dd (16.1, 8.1)	2.59, dd (16.0, 9.0)	2.59, dd (16.2, 9.0)
4b	2.78, ddd (17.0, 5.9, 2.4)	2.79, m	2.72, m	2.88, dd (16.1, 5.3)	3.02, dd (16.2, 5.7)	3.03, dd, (16.2, 5.9)
6	6.02, s	6.03, s	6.10, s	-	6.05, s	6.05, s
8	-	-	-	5.97, s	-	-
2''/6'	7.35, d (8.5)	7.37, d (8.5)	7.35, d (8.6)	7.24, d (8.6)	7.34, d (8.4)	7.36, d (8.6)
3''/5'	6.85, d (8.5)	6.88, d (8.5)	6.87, d (8.6)	6.84, d (8.6)	6.85, d (8.4)	6.87, d (8.6)
2''/6''	6.91, d (7.3)	6.79, d (8.7)	6.71, d (8.6)	7.29, m	6.89, d (7.2)	6.78, d (8.6)
3''/5''	7.16, t (7.3)	6.72, d (8.7)	6.64, d (8.6)	7.29, m	7.15, t (7.2)	6.71, d (8.6)
4''	7.10, t (7.3)	-	-	7.18, m	7.09, t (7.2)	-
7''	2.84, t (8.1 Hz)	2.77, m	2.75, m	3.00, t (7.7)	2.84, t (7.9)	2.76, t (7.9)
8''	3.24, m	3.19, m	3.20, m	3.43, t (7.7)	3.22, m	3.16, m
7-OH	13.82, s	13.81, s	13.92, s	-	13.76, s	13.83, s
4''-O- CH ₃	-	3.74, s	-	-	-	3.74, s
5-O- CH ₃	-	-	3.89, s	-	-	-

Table 12: ^{13}C NMR spectroscopic data of compounds **149** to **154** in acetone- d_6 (100 MHz)

No.	δ_c , mult.					
	(\pm)- 149	(\pm)- 150	(\pm)- 151	(\pm)- 152	(\pm)- 153	(\pm)- 154
2	79.9, d	79.9, d	79.8, d	83.3, d	83.8, d	83.8, d
3	29.1, t	29.1, t	29.1, t	67.5, d	67.1, d	67.1, d
4	20.4, t	20.4, t	20.3, t	27.7, t	29.3, t	29.4, t
5	163.2, s	163.1, s	164.7, s	165.0, s	163.3, s	164.0, s
6	96.1, d	96.0, d	92.8, d	105.4, s	96.5, d	96.5, d
7	166.0, s	166.0, s	166.1, s	160.6, s	166.1, s	165.8, s
8	105.7, s	105.7, s	106.1, s	95.1, s	105.4, s	105.1, s
9	159.7, s	159.7, s	158.7, s	161.8, s	158.7, s	158.7, s
10	102.0, s	102.0, s	102.7, s	101.2, s	101.3, s	101.5, s
1'	132.7, s	132.7, s	132.6, s	130.6, s	130.1, s	130.3, s
2'/6'	128.9, d	129.0, d	128.8, d	129.4, d	129.9, d	130.0, d
3'/5'	116.2, d	116.2, d	116.2, d	115.9, d	116.1, d	116.1, d
4'	158.3, s	158.4, s	158.4, s	158.2, s	158.4, s	158.4, s
1''	142.3, s	134.1, s	132.7, s	142.9, s	142.2, s	134.1, s
2''/6''	129.1, d	129.9, d	129.9, d	129.3, d	129.0, d	129.9, d
3''/5''	129.0, d	114.4, d	115.8, d	129.2, d	129.0, d	114.4, d
4''	126.4, d	158.7, s	156.2, s	126.7, d	126.4, d	158.7, s
7''	31.2, t	30.3, t	30.4, t	31.4, t	31.2, t	30.6, t
8''	46.1, t	46.4, t	46.6, t	46.5, t	45.9, t	46.3, t
9''	205.2, s	205.4, s	205.8, s	205.6, s	205.2, s	205.4, s
5-O-CH ₃	-	-	56.3, q	-	-	-
4''-O-CH ₃	-	55.4, q	-	-	-	55.3, q

Table 13: Antibacterial activity and cytotoxicity of enantiomers of compounds **149-154**

Compounds	Antibacterial activity	Cytotoxicity
	MIC (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^b
(-)-149	6.25	> 50
(+)-149	6.25	> 50
(-)-150	> 50	> 50
(+)-150	> 50	> 50
(-)-151	> 50	> 50
(+)-151	> 50	> 50
(-)-152	50	> 50
(+)-152	50	> 50
(-)-153	25	> 50
(+)-153	25	> 50
(-)-154	25	> 50
(+)-154	25	> 50
Chloramphenicol	2.91	-
Gentamycin	0.020	-
Etoposide	-	23 \pm 3 ^c

^aMinimal inhibitory Concentration of *S. aureus* growth after 24 h.

^bConcentration inhibiting the growth of fifty percent of human skin fibroblasts WS1 growth after 48 h.

^cMean \pm SD (n=3).

ND, not determined

CHAPITRE 6

BALSACONE J AND K: ANTIBACTERIAL HYDROXYCINNAMATE ESTER-SUBSTITUTED DIHYDROCHALCONES AS RACEMATES FROM *POPULUS BALSAMIFERA* BUDS

François Simard, Serge Lavoie, Jean Legault and André Pichette*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555, boul. de l'Université, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

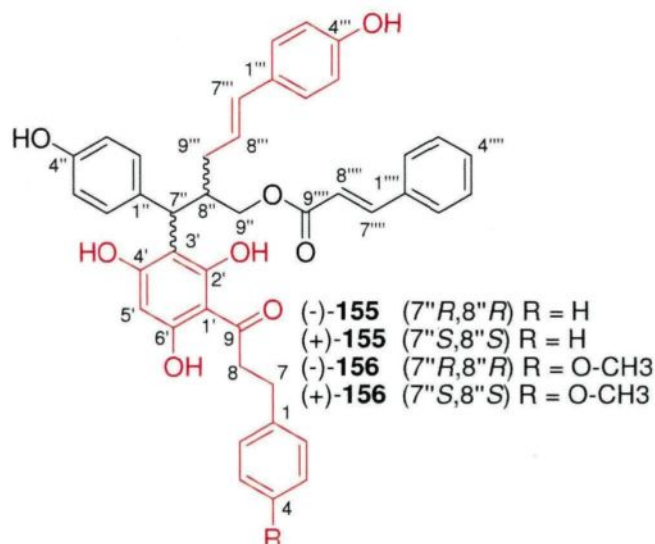
andre_pichette@uqac.ca

(Article à soumettre à *Organic Letters*)

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (F. Simard) a rédigé toutes les sections du manuscrit, effectué les travaux de fractionnement et la caractérisation des composés. S. Lavoie a contribué à la caractérisation des composés (analyse RMN, calculs de spectres de dichroïsme circulaire) en plus de réviser le manuscrit. J. Legault et A. Pichette sont respectivement les codirecteur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



RÉSUMÉ

Les balsacones J (**155**) et K (**156**), dont les structures hybrides entre une dihydrochalcone et un ester d'acide hydroxycinnamique sont inédites, ont été isolées sous forme de mélanges racémiques à partir de bourgeons de *P. balsamifera*. Leurs structures ont été déterminées grâce à l'analyse de données spectrales (RMN 1D et 2D, IR, et spectrométrie de masse). Les énantiomères de ces deux mélanges ont pu être purifiés par HPLC en utilisant un support chiral. La détermination de la configuration absolue de ces énantiomères est en cours, mais n'a pu être complétée à temps pour le dépôt de cette thèse. La comparaison des spectres de dichroïsme circulaire obtenus grâce à des calculs basés sur des fondements théoriques aux spectres expérimentaux devrait permettre d'y arriver. L'activité antibactérienne et la cytotoxicité des composés isolés ont été évaluées *in vitro* contre *S. aureus* et une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1) respectivement.

ABSTRACT

Balsacones J (**155**) and K (**156**), two unprecedented hydroxycinnamate ester-substituted dihydrochalcones, were isolated as racemic mixtures from the buds of *Populus balsamifera*. Chiral separation yielded purified enantiomers and the determination of their absolute configuration using ECD

calculations is still ongoing. Antibacterial activity and cytotoxicity of isolated compounds were evaluated against *S. aureus* and human skin fibroblast cells (WS1) respectively.

INTRODUCTION

Buds of trees from genus *Populus* are covered with exudates which are known to contain a variety of hydroxycinnamates and their derivatives as their main components (Chen et al. 2009). These exudates are also recognized as one of the plant sources of the widely use traditional medicine propolis (Salatino et al. 2011). *P. balsamifera* buds are covered with such an exudate and North America aboriginals extensively used these buds in their traditional remedies (Uprety et al. 2012). Early investigations about the chemical composition of extracts from *P. balsamifera* buds resulted in the identification of alkanes (Isidorov et Vinogorova 2003), fatty acids (Polyakov et al. 1985; Isidorov et Vinogorova 2003), terpenes (Mattes et al. 1987; Isidorov et Vinogorova 2003), phenols (Greenaway et al. 1989; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), flavonoids (Kurkin et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), chalcones (Greenaway et al. 1989; Kurkin et al. 1990; Sentsov et al. 1997; Isidorov et Vinogorova 2003), carbohydrates (Isaeva et Ryazanova 2006) and prostaglandins (Levin et al. 1990). Recently, the presence of hydroxycinnamylated dihydrochalcones having significant antibacterial activity against *S. aureus* was reported (Lavoie et al. 2013). The isolation and structure elucidation of balsacones J (**155**) and K (**156**), two unprecedented hydroxycinnamate ester-substituted dihydrochalcones from *P. balsamifera* buds, are presented in this paper. Interestingly, both compounds were obtained as racemic mixtures. Chiral HPLC yielded the purified enantiomers. Comparison of experimental ECD spectra of the isolated enantiomers with calculated ECD spectra obtained using the time dependent density functional theory (TDDFT) is still ongoing. This comparison should allow to determine the absolute configuration of the isolated enantiomers. Antibacterial activity and cytotoxicity of all isolated compounds were evaluated against *S. aureus* and human skin fibroblast cells (WS1) respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Buds of *P. balsamifera* previously immersed in liquid nitrogen were ground and extracted with 95 % EtOH under reflux. The ethanolic extract was dried, suspended in MeOH and extracted with hexane. The dried MeOH extract was then suspended in Et₂O and treated with water. The Et₂O extract was fractionated by silica gel and reversed phase C₁₈ silica gel CC. Preparative HPLC purifications afforded compounds **155** and **156**.

Balsacone J (**155**) was obtained as a greyish powder. Its molecular formula was established as C₄₂H₃₈O₈ (24 degrees of unsaturation) based on the [M+Na]⁺ quasi-molecular ion at 693.2444 (calcd 693.2459) in the HRMS spectrum. The IR spectrum of **155** showed bands at 3332 (phenol), 1694 (carbonyl) and 1612 (carbonyl) cm⁻¹. The ¹H and ¹³C NMR data (table 14) combined with information from DEPT135 and HSQC spectra suggested the presence of two carbonyls, five oxygenated aromatic quaternary carbons, six aromatic quaternary carbons, fifteen sp² methines, two sp³ methines and four methylenes indicating that some of these signals represented equivalent carbons. Detailed analysis of 1D ¹H, 2D-COSY and HSQC experiments allowed to establish seven structural fragments (figure 24): two monosubstituted aromatic rings (A and B), two disubstituted aromatic rings (C and D), a CH₂CH₂ coupling system (E), a trans alkene (F) and a larger coupling system including a trans alkene, two methines and two diastereotopic methylenes (G). HMBC correlations of δ_H 2.90 (2H, t, J = 7.8 Hz, H-7) with δ_C 205.5 (C-9) and of δ_H 7.24 (2H, m, H-2) with δ_C 31.4 (C-7) indicated that fragment E was attached to fragment A and to a ketone thus resulting in a dihydrocinnamoyl unit (figure 24). Fragment F was found to be linked to fragment B and to an ester based on HMBC correlations of δ_H 7.67 (1H, m, H-7''') and δ_H 7.44 (2H, m, H-3''') with δ_C 135.6 (C-1''') and of δ_H 6.50 (1H, d, 16.1 Hz, H-8''') with δ_C 167.0 (C-9''') thus resulting in a cinnamate unit. The presence of the cinnamate unit was confirmed by the presence of a m/z = 523 fragment [M-C₉H₇O₂]⁺ in the MS spectrum (figure 24). HMBC correlations of δ_H 6.27 (1 H, d, 15.9 Hz, H-7''') and δ_H 6.75 (2H, d, 8.6 Hz, H-3''') with δ_C 130.4 (C-1''') indicated that the alkene of fragment G was attached to fragment C. Furthermore, HMBC correlations of δ_H 4.60 (1H, d, J = 11.7 Hz, H-7'') and δ_H 6.75 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3'') with δ_C 135.7 (C-1'') and

of δ_{H} 4.15 (1H, dd, $J = 11.1, 4.9$ Hz, H-9'') with δ_{C} 167.0 (C-9''') indicated that fragment G was also attached to fragment D and to the cinnamate unit. Finally, the dihydrocinnamoyl unit and fragment G were both found to be attached to the same penta-substituted aromatic ring according to HMBC correlations of δ_{H} 6.07 (1H, s, H-5') with C-9 and δ_{C} 110.3 (C-3'), and of H-7'' with C-3'. Assignations of this penta-substituted aromatic ring were determined according to the following HMBC correlations: H-5' with δ_{C} 160.5 (C-6'), δ_{C} 162.9 (C-4'), C-3' and δ_{C} 105.0 (C-1') and H-7'' with C-4' and δ_{C} 165.7 (C-2'). Based on the above evidences, balsacone J (**155**) was characterized as (*E*)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-((4-hydroxyphenyl)(2,4,6-trihydroxy-3-(3-phenylpropanoyl)phenyl)methyl)pent-4-en-1-yl cinnamate.

Balsacone K (**156**) was isolated as a greyish powder. Its molecular formula was established as $\text{C}_{43}\text{H}_{40}\text{O}_9$ (24 degrees of unsaturation) based on the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ quasi-molecular ion at 723.2553 (calcd 723.2565) in the HRMS spectrum. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **156** were almost identical to those of **155** but with the presence of additional signals corresponding to a methoxy group at δ_{H} 3.73 (3H, s, 4-OCH₃) and δ_{C} 55.4 (4-OCH₃). This group was determined to be positioned at C-4 based on the HMBC correlations between the methoxy protons and δ_{C} 158.9 (C-4) and between δ_{H} 7.13 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2) and C-4. Based on the above evidences, balsacone K (**156**) was characterized as (*E*)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-((4-hydroxyphenyl)(2,4,6-trihydroxy-3-(3-(4-methoxyphenyl)propanoyl)phenyl)methyl)pent-4-en-1-yl cinnamate.

Balsacone J (**155**) and K (**156**) were found to be racemic based on the absence of CE on their ECD spectra and the values of 0° obtained from optical rotation measurements. Semi-preparative chiral HPLC purification yielded (-)-balsacone J ((-)-**155**), (+)-balsacone J ((+)-**155**), (-)-balsacone K ((-)-**156**) and (+)-balsacone K ((+)-**156**). ECD spectra calculations for (7''*R*,8''*R*)-**155**, (7''*R*,8''*S*)-**155**, (7''*R*,8''*R*)-**156** and (7''*R*,8''*S*)-**156** using the TDDFT are ongoing in order to compare them with experimental ECD spectra (figure 25) and thus determine the absolute configuration of isolated compounds. These results will be included in the manuscript prior to submission.

A possible biosynthetic pathway for balsacones J (**155**) and K (**156**) is proposed as shown in figure 26. Coumaryl cinnamate (**125**) is proposed as a likely precursor since it has previously been identified in bud exudates of *Populus* species (Greenaway et al. 1992a). First, hydroxycinnamylation would lead to intermediate **A**, which would then undergo an anti addition of a dihydrochalcone moiety (**75** or **77**). This addition would yield racemic **155** and **156** (figure 26). Hydroxycinnamylation is an uncommon biosynthetic step, but hydroxycinnamylated dihydrochalcones have recently been isolated from an ethanolic extract of *P. balsamifera* buds (Lavoie et al. 2013). Also, dihydrochalcones **75** and **77** are known components of *P. balsamifera* buds (Greenaway et al. 1992b).

All isolated compounds showed moderate antibacterial activity against *S. aureus* after 24 h of incubation with MIC ranging from 25 to 50 μM (table 15). Stereochemistry of positions 7'' and 8'' of **155** and **156** did not seem to have any impact on the antibacterial activity since (-) and (+) enantiomers as well as racemic mixtures showed similar MIC. All compounds also showed moderate cytotoxicity against human skin fibroblast cell line WS1 with IC_{50} ranging between 25 ± 1 and $33 \pm 4 \mu\text{M}$.

ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by NSERC (doctoral scholarship to FS) and Fonds de recherche nature et technologies (doctoral scholarship to FS). The authors would like to thank F. Otis and N. Voyer from PROTEO and Université Laval for their help in recording circular dichroism spectra and C. Dusseault for its technical assistance in the evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity.

SUPPORTING INFORMATION

NMR spectra (^1H and ^{13}C) for (\pm)-**155** and (\pm)-**156** were included. This material is available free of charge via the Internet (annexe 2).

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures

Optical rotations were determined at the sodium D line (590 nm) on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. Absorption UV spectra were performed using an Agilent 8453 diode-array spectrophotometer. ECD spectra were recorded on a Jasco J-815 CD spectrometer. IR spectra were performed using a Perkin-Elmer SpectrumOne (neat, thin films, on NaCl plates) instrument. ^1H NMR, ^{13}C NMR and 2D NMR (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC and HMBC) spectra were performed using an Avance 400 Bruker spectrometer (400.13 MHz for ^1H , 100.61 MHz for ^{13}C spectra) equipped with a 5 mm QNP probe in acetone- d_6 . Chemical shifts values were reported in ppm (δ) relative to TMS. High resolution ESIMS spectra were obtained with an Agilent Technologie 6210 TOFMS system. Low resolution APCIMS (positive mode) were obtained with an Agilent G1946 VL Mass Selective Detector. Column chromatography was performed using Ultra pure silica gel (40-63 μm) supplied by Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Reversed phase flash chromatography was performed on a Biotage Flash+ system using a C18 40iM cartridge (17 %, 135g) from Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Semi-preparative HPLC was carried out on an Agilent 1100 Series equipped with a UV-vis detector at 254 nm with an Inerstil Prep ODS column (20 mm \times 250 mm, 10 μm). Chiral semi-preparative HPLC was conducted with the same instrument using a RegisPack chiral column (10.0 mm \times 250 mm, μm). Reagents and analytical grade solvents were purchased from VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada) and were used as received.

Plant Material

Buds from different trees of *P. balsamifera* were collected in March 2005 near Chicoutimi, Québec province, Canada. The plant was authenticated by Mr. Patrick Nadeau (Université du Québec à Chicoutimi) and a voucher specimen (No. 499678) was deposited at the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec City, Canada. After collection, buds were kept frozen until extraction.

Extraction and Isolation

Buds were ground and extracted as previously described (submitted manuscript, chapitre 5). The obtained residue was fractionated by liquid-liquid extractions and multiple chromatography steps to afford

7 subfractions (B1 to B7) (submitted manuscript, chapitre 5). Sufraction B6 (960.7 mg) was applied to silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 2:1, followed by MeOH) to obtain 6 other fractions (B6I to B6VI). Subfraction B6III (92.4 mg) was submitted to semi-preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20) to obtain racemic mixture (±)-**155** (32.4 mg), which was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 70:30) to afford (-)-**155** (17.2 mg) and (+)-**155** (9.5 mg). Semi preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20) of subfraction B6IV (147.1) yielded racemic mixture (±)-**156** (29.2 mg), which was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 70:30) to afford (-)-**156** (8.5 mg) and (+)-**156** (5.8 mg).

(-)-balsacone J [(-)-**155**]: greyish powder; $[\alpha]_D^{24}$ - 8.3 (c 0.23, MeOH); ECD (c 0.37×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{251} = -2.7$, $\Delta\epsilon_{275} = +4.7$, $\Delta\epsilon_{302} = -0.9$; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 203 (4.84), 275 (4.68), 326 (3.98) nm; IR (neat, thin film) ν_{\max} 3338, 3027, 2952, 1697, 1611, 1512, 1439, 1366, 1244, 1175, 1109, 1076, 1033, 977, 830, 769, 684 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR data, see table 14; APCIMS 671 [M+H]⁺ (28), 523 (100), 419 (17) 259 (17), 133 (56); HRESIMS *m/z* 693.2444 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₂H₃₈O₈Na, 693.2459).

(+)-balsacone J [(+)-**155**]: greyish powder; $[\alpha]_D^{24}$ + 31.0 (c 0.13, MeOH); ECD (c 0.34×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{254} = +5.4$, $\Delta\epsilon_{275} = -8.4$, $\Delta\epsilon_{300} = +2.8$; UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, APCIMS and HRESIMS data were the same as (-)-**155**.

(-)-balsacone K [(-)-**156**]: greyish powder; $[\alpha]_D^{24}$ - 22.3 (c 0.12, MeOH); ECD (c 0.29×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{253} = -4.8$, $\Delta\epsilon_{274} = +7.3$, $\Delta\epsilon_{301} = -2.2$; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (4.72), 274 (4.69), 330 (4.18) nm; IR (neat, thin film) ν_{\max} 3338, 3027, 2952, 1697, 1611, 1512, 1439, 1366, 1244, 1175, 1109, 1076, 1033, 977, 830, 769, 684 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR data, see table 14; APCIMS 701 [M+H]⁺ (12), 553 (100), 391 (7), 289 (21), 133 (80); HRESIMS *m/z* 723.2553 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₃H₄₀O₉Na, 723.2565).

(+)-balsacone K [(+)-**156**]: greyish powder; $[\alpha]_D^{25}$ + 32.0 (c 0.084, MeOH); ECD (c 0.41×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{253} = +6.3$, $\Delta\epsilon_{275} = -9.2$, $\Delta\epsilon_{299} = +3.0$; UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, APCIMS and HRESIMS data were the same as (-)-**156**.

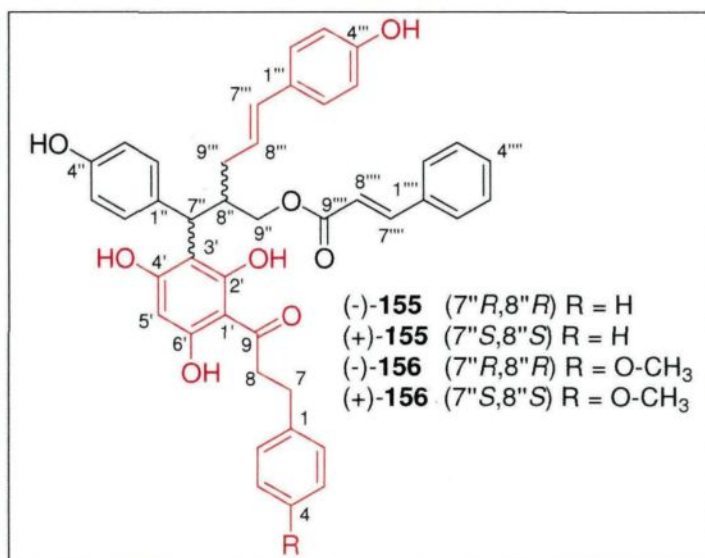
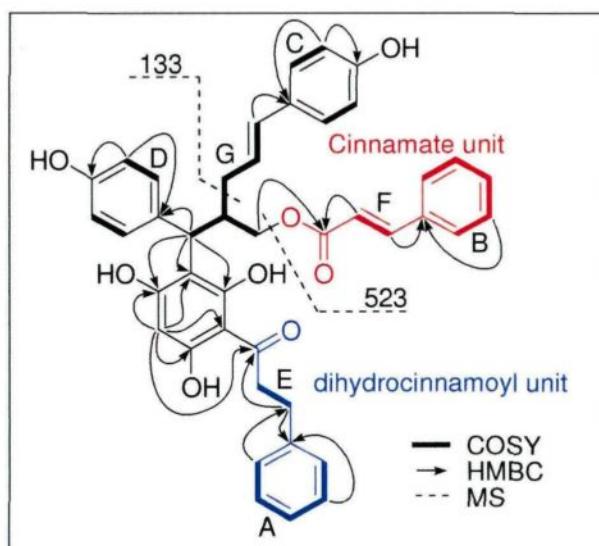
Bioassays

Antibacterial activity

Antibacterial activity against *S. aureus* was evaluated using the microdilution method as reported previously (Banfi et al. 2003; Lavoie et al.). The lowest concentration at which no growth was observed after 24 h of incubation was defined as the minimum inhibitory concentration (MIC). Gentamycin and Chloramphenicol were used as positive controls.

Cytotoxicity

Cytotoxicity was evaluated against human fibroblast cell line WS1 using the resazurin reduction test reported previously (O'Brien et al. 2000; Bellifa et al. 2011). Cytotoxicity was expressed as the concentration inhibiting 50 % of cell growth (IC_{50}). Etoposide was used as a positive control.

Figure 23: Structures of **155** and **156**Figure 24: HMBC, COSY and MS key data for identification of compound **155**.

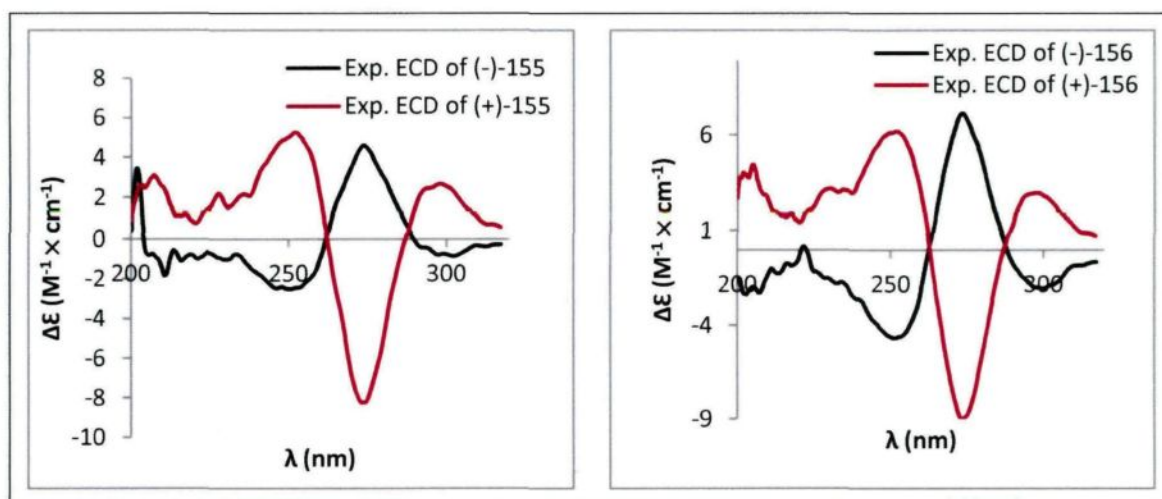


Figure 25: Experimental ECD spectra for compounds (-)-155, (+)-155, (-)-156 and (+)-156

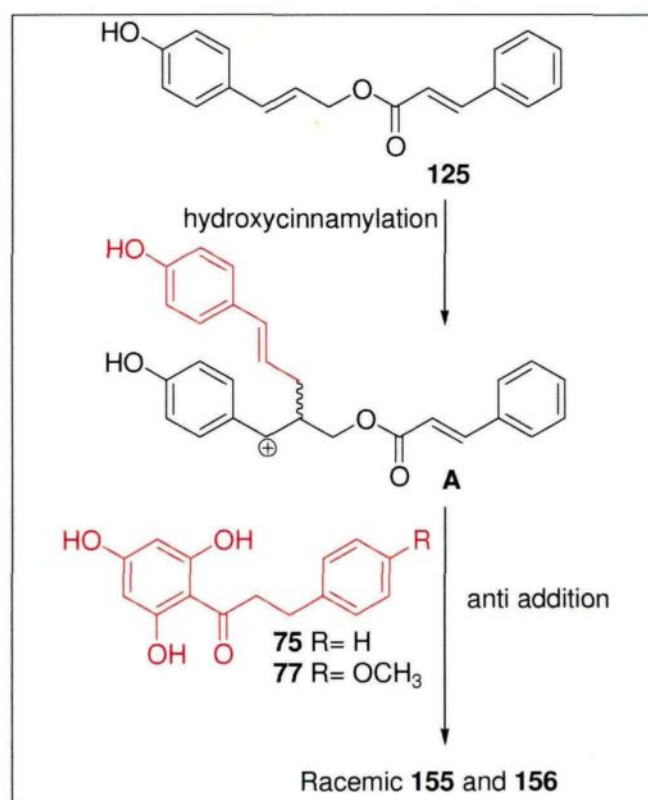


Figure 26: Possible biosynthetic pathway for 155 and 156

Table 14: NMR data of **155** and **156** (acetone-d₆, δ in ppm, J in Hz).

no.	155		156	
	δ _c	δ _h	δ _c	δ _h
1	142.9	-	134.7	-
2	129.3	7.24 (2H, m)	130.1	7.13 (2H, d, 8.6)
3	129.1	7.24 (2H, m)	114.5	6.80 (2H, d, 8.6)
4	126.6	7.14 (1H, m)	158.9	-
7	31.4	2.90 (2H, t, 7.8)	30.6	2.84 (2H, t, 7.7)
8	46.5	3.32 (2H, t, 7.8)	46.8	3.28 (2H, t, 7.7)
9	205.5	-	205.7	-
1'	105.0	-	105.1	-
2'	165.7	-	165.7	-
3'	110.3	-	110.3	-
4'	162.9	-	162.9	-
5'	95.4	6.07 (1H, s)	95.3	6.04 (1H, s)
6'	160.6	-	160.5	-
1''	135.7	-	135.7	-
2''	130.8	7.50 (2H, d, 8.6)	130.8	7.50 (2H, d, 8.6)
3''	115.5	6.75 (2H, d, 8.6)	115.5	6.75 (2H, d, 8.6)
4''	156.3	-	156.3	-
7''	42.1	4.60 (1H, d, 11.7)	42.1	4.60 (1H, d, 11.6)
8''	39.1	3.43 (1H, m)	39.1	3.42 (1H, m)
9''	65.9	4.15 (1H, dd, 11.1, 4.9) 4.29 (1H, dd, 11.1, 3.2)	65.9	4.15 (1H, dd, 11.0, 5.0) 4.29 (1H, dd, 11.0, 3.0)
1'''	130.4	-	130.5	-
2'''	128.0	7.22 (2H, m)	128.0	7.23 (2H, d, 8.6)
3'''	116.1	6.75 (2H, d, 8.6)	116.1	6.75 (2H, d, 8.6)
4'''	157.4	-	157.5	-
7'''	132.1	6.27 (1H, d, 15.9)	132.1	6.27 (1H, d, 15.9)
8'''	126.2	6.17 (1H, m)	126.2	6.17 (1H, m)
9'''	34.6	2.41 (1H, m) 2.23 (1H, dt, 14.0, 8.4)	34.6	2.40 (1H, m) 2.23 (1H, m)
1''''	135.6	-	135.6	-
2''''	129.0	7.64 (2H, m)	129.0	7.65 (2H, m)
3''''	129.7	7.44 (2H, m)	129.8	7.44 (2H, m)
4''''	131.0	7.44 (1H, m)	131.0	7.44 (1H, m)
7''''	144.7	7.67 (1H, m)	144.7	7.67 (1H, m)
8''''	119.4	6.50 (1H, d, 16.1)	119.4	6.50 (1H, d, 16.1)
9''''	167.0	-	167.0	-
4-OCH ₃	-	-	55.4	3.73 (3H, s)
-OH	-	14.57 (1H, s)	-	14.60 (1H, s)

Table 15: Antibacterial activity and cytotoxicity of **155** and **156**

Compounds	Antibacterial activity MIC (μM) ^a	Cytotoxicity IC ₅₀ (μM) ^b
155	50	30 \pm 1
(-)- 155	>50	33 \pm 3
(+)- 155	25	32 \pm 4
156	25	33 \pm 4
(-)- 156	25	25 \pm 1
(+)- 156	25	26.3 \pm 0.3
Chloramphenicol	0.94	ND
Gentamycin	0.020	ND
Etoposide	ND	23 \pm 3

^aMinimal Inhibitory Concentration of *S. aureus* growth after 24h

^bConcentration inhibiting the growth of fifty percent of human skin fibroblasts WS1 growth after 48 h, mean \pm SD (n = 3)

ND, not determined

CHAPITRE 7

BALSACONE L-O, ANTIBACTERIAL HYDROXYCINNAMYLATED DIHYDROCHALCONES FROM *POPULUS BALSAMIFERA* BUDS

François Simard[†], Éric Chiasson[†], Serge Lavoie[†], Jean Legault[†], André Pichette^{†,*}

[†]Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi (Québec), Canada, G7H 2B1

* Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011; fax: +1 418 545 5012. E-mail address: andre_pichette@uqac.ca (A. Pichette).

(Article à soumettre dans *Journal of Natural Products*)

Keywords: *Populus balsamifera* L, *Salicaceae*, bud, flavan, dihydrochalcones, enantiomer, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, circular dichroism, x-ray diffraction

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (F. Simard) a rédigé toutes les sections du manuscrit, effectué les travaux d'isolement et la caractérisation des composés. S. Lavoie a contribué à la caractérisation des composés (analyse RMN, calculs de spectres de dichroïsme circulaire). É. Chiasson a participé aux travaux d'isolement des composés. J. Legault et A. Pichette sont respectivement les codirecteur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ

Une étude phytochimique portant sur les bourgeons de *P. balsamifera* a mené à l'isolement de six nouveaux dérivés de dihydrochalcone hydroxycinnamylés constituant trois paires d'énantiomères en plus d'un septième racémique. Deux énantiomères du composé connu iryantherin-D, dont la configuration absolue n'avait jamais été déterminée, ont aussi été isolés. La structure des balsacones L (**157**), M (**159**), N (**160**) et O (**161**) a été déterminée par des analyses de données spectrales obtenues par RMN 1D et 2D, par spectroscopie infrarouge ainsi que par spectrométrie de masse. Les paires d'énantiomères des balsacones L (**157**), M (**159**) et N (**160**), ainsi que de l'iryantherin-D, ont été obtenues suite à des purifications effectuées par HPLC en utilisant un support chiral. Leur configuration absolue a été déterminée grâce à des analyses de diffraction de rayon X et grâce aux comparaisons de leurs spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux à ceux obtenus par des calculs théoriques. L'activité antibactérienne et la cytotoxicité des composés isolés ont été évaluées *in vitro* contre *S. aureus* et une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1) respectivement.

ABSTRACT

A phytochemical investigation of buds from the hardwood tree *P. balsamifera* led to the isolation of six new cinnamylated dihydrochalcone derivatives as pairs of racemates and one as a racemic mixture along with known iryantherin-D. Structures of balsacones L (**157**), M (**159**), N (**160**) and O (**161**) were elucidated on the basis of spectroscopic data (1D and 2D NMR, IR, MS). Chiral HPLC purifications were carried out, and the absolute configuration of the isolated enantiomers were established based on X-ray diffraction analysis and ECD computational calculations. Absolute configuration of (+) and (-)-iryantherin-D was also determined for

the first time. Antibacterial activity and cytotoxicity of all isolated compounds were evaluated *in vitro* against *S. aureus* and human skin fibroblast cells (WS1) respectively.

INTRODUCTION

The fight against bacterial infections seemed almost over 50 years ago. The antibiotic arsenal was sufficient to treat most infections. Unfortunately, antibiotic resistance in bacteria species has spread much faster than expected. Today, cases of methicillin-resistant *S. aureus* (SARM) represent nearly 50 % of all *S. aureus* infections in the US (Gootz 2010). This is not to mention the apparition of multi-drug-resistant bacterial pathogens that can only be treated with last-line antibiotics such as carbapenems (Carlet et al. 2012). While the raise of antibiotics resistance can be slowed by a more rational use, antibiotics having new mechanism of action will always be needed for the treatment of resistant strains (Bush et al. 2011). Historically, microbe secondary metabolism has been the most successful source for the discovery of new antibiotic scaffolds. However, only two new classes of antibiotics have reached the market over the last 50 years (Coates et al. 2011), prompting the exploration of other strategies. Natural products from plants can be considered as a potential source of new antibiotic scaffolds. Indeed, the use of plants to treat infections is widespread in traditional medicine from around the world (Navarro et al. 1996; Omar et al. 2000; Bonjar 2004; Koné et al. 2004; Uprety et al. 2012). Also, antibacterial properties for many plants natural products have been shown *in vitro* (Gibbons 2004; Saleem et al. 2010).

Reports from the traditional medicine of Canada Aboriginals frequently mention the use of buds from *P. balsamifera* L (Uprety et al. 2012). Treatment of dermatological and gastrointestinal troubles are examples of their many traditional uses. Recently, our team has undertaken the task of identifying compounds implicated in the *in vitro* antibacterial activity of an ethanolic *P. balsamifera* buds extract. This work resulted in the identification of new hydroxycinnamylated dihydrochalcones showing *in vitro* antibacterial activities with MIC ranging from 6.25 to 50 μ M against *S. aureus* (Lavoie et al. 2013). In this paper, we present the results of further investigation of the *P. balsamifera* buds ethanolic extract. Eight

hydroxycinnamylated dihydrochalcone derivatives were isolated as pairs of racemates and one as a racemic mixture. Their structures were elucidated based on the analysis of spectroscopic data and their absolute configuration were established with the help of X-ray single crystal diffraction analysis and ECD calculations. Amongst isolated racemic mixture and purified enantiomers, twelve showed *in vitro* antibacterial activity against *S. aureus* with MIC ranging from 1.56 to 25 μM . Most compounds showed cytotoxicity against human skin fibroblast cells (WS1) with IC_{50} ranging between 7.4 ± 0.6 and $45 \pm 3 \mu\text{M}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Fractionation of a *P. balsamifera* buds ethanolic extract by liquid-liquid extractions, silica gel and reversed phase CC followed by preparative HPLC purifications led to compounds **157-161**.

Balsacone L (**157**) was obtained as a yellow powder. Its molecular formula was established as $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (19 degrees of unsaturation) based on the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ quasi-molecular ion peak at 545.1945 (calcd 545.1935) in the HRMS spectrum. The IR spectrum of **157** showed bands at 3352 cm^{-1} (phenol) and 1612 cm^{-1} (carbonyl). The ^1H and ^{13}C NMR data (table 16 and 17 respectively) combined with information from Dept135 and HSQC spectra suggested the presence of one carbonyl, five oxygenated aromatic quaternary carbons, five aromatic quaternary carbons, nine sp^2 methines, two sp^3 methines (one oxygenated) and four methylenes, indicating that some of these signals represented equivalent carbons. Detailed analysis of 1D ^1H , 2D-COSY and HSQC experiments (figure 28) showed signals for two 1,4-disubstituted aromatic rings at δ_{H} 6.92 (2H, d, 8.5 Hz, H-3'), 7.39 (2H, d, 8.5 Hz, H-2'), 6.77 (2H, d, 8.5 Hz, H-3''') and 7.23 (2H, d, 8.5 Hz, H-2''') and one monosubstituted aromatic ring at δ_{H} 6.83 (2H, d, 7.1 Hz, H-2''), 7.15 (2H, t, 7.1 Hz, H-3'') and 7.08 (1H, t, 7.1 Hz, H-4''). In the COSY spectrum, another coupling system consisting of a sp^3 methine at δ_{H} 2.29 (1H, m, H-3) coupled to a diastereotopic methylene at δ_{H} 2.40 (1H, dd, 16.3 and 11.2 Hz, H-4a) and 2.91 (1H, dd, 16.2 and 5.0 Hz, H-4b) and to another sp^3 methine at δ_{H} 4.85 (1H, d, 9.4 Hz, H-2) was reminiscent of the ring C signals of a flavan skeleton. Indeed, HMBC correlations of H-2' with δ_{C} 84.2 (C-2) and δ_{C} 158.6 (C-4') showed that one of the 1,4-disubstituted aromatic ring was oxygenated and linked to C-2 thereby forming

the ring B of the flavan skeleton. The presence of a chelated phenolic hydrogen was detected based on the signal at δ_{H} 13.78 (1H, s, 7-OH) on the ^1H NMR spectrum. Its HMBC correlations with δ_{C} 163.2 (C-5), δ_{C} 166.0 (C-7) and δ_{C} 105.5 (C-8) suggested it was situated on ring A of the flavan skeleton. Assignments of other signals associated with ring A were deduced from the following HMBC correlations (figure 28): δ_{H} 6.02 (1H, s, H-6), H-4a, and H-4b with C-5; H-6 with C-7, C-8 and δ_{C} 102.2 (C-10); H-4a and H-4b with δ_{C} 159.3 (C-9). Another coupling system detected on the COSY spectra consisted of two methylenes at δ_{H} 2.82 (2H, dd, 9.2 and 7.7 Hz, H-7'') and 3.17 (2H, m, H-8''). The HMBC correlations of H-7'' and H-8'' with δ_{C} 205.3 (C-9'') and of H-2'' with δ_{C} 31.1 (C-7'') suggested that the two methylenes were linked to a ketone and to the monosubstituted aromatic ring resulting in a dihydrocinnamoyl unit. A W coupling between H-6 and C-9'' observed on the HMBC spectrum indicated that the dihydrocinnamoyl unit was attached to ring A. Also, APCI(+)MS fragment of m/z 271 corresponding to the typical retro Diels Alder fragment of flavonoids (Pelter et al. 1965) was present (figure 28). With only positions 6 and 8 available, it was determined that the dihydrocinnamoyl unit was in 8 based on the 2-D NOESY correlations of H-8'' with H-2 and H-2'. The remaining signals were composed of an allyl at δ_{H} 6.32 ppm (1H, d, 16.0 Hz, H-7'''), 6.04 (1H, m, H-8'''), 2.02 (1H, m, H-9'''a) and 2.19 (1H, m, H-9'''b) and the second 1,4-disubstituted aromatic ring. The HMBC correlations of H-2''' with δ_{C} 132.6 (C-7''') and δ_{C} 157.6 (C-4''') indicated that the 1,4-disubstituted aromatic ring was oxygenated and linked to the allyl group resulting in a 4-hydroxycinnamyl unit. The only available position for this unit was 3, which was confirmed by the HMBC correlation of H-4a with δ_{C} 36.2 (C-9'''). Based on the above evidence, Balsacone L (**157**) was characterized as 1-[3-((*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-propen-1-yl)-3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-3-phenylpropan-1-one.

Balsacone M (**159**) was obtained as a yellow powder. Its molecular formula was established as $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{O}_7$ (19 degrees of unsaturation) based on the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ quasi-molecular ion at 575.2042 (calcd 575.2040) in the HRMS spectrum. The NMR spectroscopic data of **159** (table 16 and 17) were similar to those of **157**. The first difference observed was the presence of additional methoxy signals at δ_{H} 3.83 (3H, s,

5-OCH₃) and at δ_c 56.2 (5-OCH₃). The position of the methoxy was established as C-5 based on the HMBC correlation of the methoxy protons with δ_c 164.5 (C-5). The second difference observed was a change in chemical shift for the aromatic ring linked to the methylene in position 7". This change was attributed to the presence of an oxygenated functional group in position 4" as shown by its chemical shift at δ_c 156.1 (C-4"). Based on the molecular formula established for **159**, this oxygenated functional group was considered to be a phenol function thus indicating that **159** possessed a 4-hydroxydihydrocinnamoyl unit in position 8. Based on the above evidences, balsacone M (**159**) was characterized as 1-[3-((*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-propen-1-yl)-3,4-dihydro-7-hydroxy-5-methoxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-3-(4-hydroxyphenyl)-propan-1-one.

Balsacone N (**160**) was obtained as a yellow powder. Its molecular formula was established as C₃₃H₂₈O₆ based on the [M+Na]⁺ quasi-molecular ion peak at 543.1781 (calcd 543.1778) in the HRMS spectrum. The NMR spectroscopic data of **160** (table 16 and 17) were similar to those of **157** except for the dihydrocinnamoyl unit. HMBC correlations of δ_H 7.61 (1H, d, 15.7 Hz, H-7") and δ_H 8.04 (1H, d, 15.7 Hz, H-8") with δ_c 192.9 (C-9") suggested the presence of an enone. Furthermore, HMBC correlations of δ_H 7.06 (2H, d, 8.1 Hz, H-2") with δ_c 142.6 (C-7") showed that the enone was conjugated with a monosubstituted aromatic ring resulting in a cinnamoyl unit. The position of the cinnamoyl unit was determined to be C-8 based on the NOESY correlation of H-8" with δ_H 4.85 (1H, d, 9.4 Hz, H-2). Based on the above evidences, balsacone N (**160**) was characterized as 1-[3-((*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-prop-1-enyl)-3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-3-phenylprop-2-en-1-one.

Balsacone O (**161**) was obtained as a yellow powder. Its molecular formula was established as C₃₄H₃₀O₇ based on the [M+Na]⁺ quasi-molecular ion peak at 573.1871 (calcd 573.1884) in the HRMS spectrum. The NMR spectroscopic data of **161** (table 16 and 17) were similar to those of **160**. The discrepancies between the two were attributed to the presence of a methoxy at C-5 and of an additional hydroxy at C-4" in compound **161**. The position of the methoxy was determined based on the HMBC

correlation of δ_H 3.88 (5-OCH₃) with δ_C 164.7 (C-5). The presence of the additional hydroxy was deduced from the 1,4-disubstituted fragmentation pattern of H-2'' and H-3'', the chemical shift of C-4'' (160.5) and the additional oxygen in the molecular formula. Based on the above evidences, balsaf flavan O (**161**) was characterized as 1-[3-((*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-prop-1-enyl)-3,4-dihydro-7-hydroxy-5-methoxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one.

Compound **158** was previously reported as iryantherin-D in a phytochemical investigation of *Iryanthera laevis* Markgr. (Conserva et al. 1990). Spectroscopic data for **158** (¹H, ¹³C, UV and IR) were in good agreement with those of iryantherin-D. Absolute configuration of iryantherin-D was not determined in the previous investigation so, this task was undertaken in this work along with the determination of the absolute configuration of other isolated compounds.

Relative configuration of all isolated compounds was established as 2,3-*trans* based on values ranging from 9.3 to 9.8 Hz for the $J_{2,3}$ coupling constants (table 16). Optical rotations of **157-161** were 0 and no Cotton effect were observed on their ECD spectra suggesting they were racemic. Chiral analytical HPLC analysis of all isolated compounds confirmed the presence of two enantiomers in equal amounts. Chiral semi-preparative HPLC purifications were undertaken for **157-160** yielding (+)-balsacone L ((+)-**157**), (-)-balsacone L ((-)-**157**), (+)-isoryantherin-D ((+)-**158**), (-)-isoryantherin-D ((-)-**158**), (+)-balsacone M ((+)-**159**), (-)-balsacone M ((-)-**159**), (+)-balsacone N ((+)-**160**) and (-)-balsacone N ((-)-**160**). Compound **161** was not available in sufficient quantity for further chiral purification. Crystals of (-)-**157** were obtained after recrystallization from IPA and its absolute configuration was determined to be 2*S*,3*S* from single crystal X-ray diffraction analysis using direct methods (figure 29). Computational calculations of ECD spectra of 2*S*,3*S* enantiomers of compound **157-159** were also performed using time-dependent density functional theory (TDDFT). Comparison of these calculated spectra with experimental ECD spectra obtained from the isolated enantiomers allowed to determine their absolute configurations (figure 30). Indeed, experimental ECD spectra of (-)-**157**, (-)-**158** and (-)-**159** all showed two positive CEs around 225 and 260 nm and two negative

CEs around 240 and 285 nm which were in good agreement with the calculated ECD spectra indicating 2*S*,3*S* absolute configuration. X-ray diffraction analysis and ECD calculations results are in agreement with the 2*S*,3*S* absolute configuration for (-)-**157**. Experimental ECD spectra of (+)-**157**, (+)-**158** and (+)-**159** were mirror images to those of their respective (-) enantiomers and were, therefore, assigned a 2*R*,3*R* absolute configuration. In the case (+) and (-)-**160**, calculations are still ongoing to confirm the absolute configuration of both compounds and the results will be added prior to submission of this manuscript.

A possible biosynthetic pathway for compounds **157** to **161** is proposed in figure 31. Dihydrochalcones **75**, **77** and **78** and hydroxycinnamylated dihydrochalcone derivatives **149**, **150** and **151** isolated in previous work (Lavoie et al. 2013) are likely precursors of compounds **157-161**. Indeed, an additional trans hydroxycinnamylation in compounds **149**, **151** and **150** would explain the formation of compounds **157**, **159** and **158** respectively. The proposed pathway for the formation of **160** and **161** is the dehydrogenation in positions 7 and 8 of **157** and **159** respectively. Another possibility would be a pathway similar to the one leading to compound **157**, **158** and **159**, but starting from a chalcone instead of a dihydrochalcone. However, it seemed less likely since no hydroxycinnamylated chalcone precursor is known from *P. balsamifera* buds.

Antibacterial activity of racemic mixtures **157-161** and isolated enantiomers from **157-160** was evaluated *in vitro* against *S. aureus* after 24 h of incubation time. The results were expressed as minimal inhibitory concentration (MIC). Chloramphenicol and gentamycin were used as positive controls with a MIC respectively of 0.94 μ M and 0.02 μ M. Results presented in table 18 show that all compounds were active with MIC ranging between 1.56 and 25 μ M except (\pm)-**159** which was inactive at a concentration of 50 μ M. We recently established that dihydrochalcones bearing an alkyl substituent in the ring A is a scaffold that should be further explored for the possible development of a new antibiotic class (Lavoie et al. 2013). The results obtained in this work contributed to the development of this scaffold by showing that derivatives bearing a supplementary hydroxycinnamyl unit on the cyclized hydroxycinnamylated dihydrochalcone core

(149-151) also possess antibacterial activity. Cytotoxicity of isolated compounds was evaluated against a human skin fibroblast cells line (WS1). Etoposide was used as a positive control with IC_{50} of 23 ± 3 . Compounds showed moderate cytotoxicity with IC_{50} ranging between 7.4 ± 0.6 and $> 50 \mu M$.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures

The melting point was obtained on a Mettler Toledo MP70 Melting Point System (60° - 350° , $5^{\circ}/\text{min}$, uncorr.). Optical rotations were determined at the sodium D line (590 nm) on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. Absorption UV spectra were performed using an Agilent 8453 diode-array spectrophotometer. ECD spectra were recorded on a Jasco J-815 CD spectrometer. IR spectra were conducted on a Perkin-Elmer SpectrumOne (neat, thin films, on NaCl plates). ^1H NMR, ^{13}C NMR and 2D NMR (1H-1H COSY, NOESY, HSQC and HMBC) spectra were performed using an Avance 400 Bruker spectrometer (400.13 MHz for ^1H , 100.61 MHz for ^{13}C spectra) equipped with a 5 mm QNP probe in acetone- d_6 . Chemical shifts values were reported in ppm (δ) relative to TMS. High resolution ESIMS spectra were obtained with an Agilent Technologie 6210 TOFMS system. Low resolution APCIMS (positive mode) were obtained with an Agilent G1946 VL Mass Selective Detector. Column chromatography was performed using Ultra pure Silica gel (40-63 μm) supplied by Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Reversed phase flash chromatography was performed on a Biotage Flash+ system using a C18 40iM cartridge (17 %, 135g) from Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Semi-preparative HPLC was carried out on an Agilent 1100 Series equipped with a UV-vis detector at 254 nm with an Inerstil Prep ODS column (20 mm \times 250 mm, 10 μm). Chiral semi-preparative HPLC was conducted with the same instrument using a RegisPack chiral column (10.0 mm \times 250 mm, μm). Reagents and analytical grade solvents were purchased from VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada) and were used as received.

Plant Material.

Buds from different trees of *P. balsamifera* were collected in March 2005 near Chicoutimi, Québec province, Canada. The plant was authenticated by Mr. Patrick Nadeau (Université du Québec à Chicoutimi) and a voucher specimen (No. 499678) was deposited at the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec City, Canada. After collection, buds were kept frozen until extraction.

Extraction and Isolation.

Buds were ground and extracted as previously described (submitted, chapitre 5). The obtained residue was fractionated by liquid-liquid extraction and by 3 chromatography steps to afford 5 fractions (A-E) (submitted article, chapitre 5). Fraction B (6.3 g) was submitted to silica gel cc (CHCl₃-MeOH, 40:1-30:1-0:1) to afford 7 subfractions (B1 to B7). Sufraction B3 (780.3 mg) was applied to silica gel cc (CHCl₃-EtOAc, 5:1-4:1-3:1, followed by MeOH) to obtain the racemic mixture **157** (281.9 mg) and a mixture of **158** and **160** which was purified by semi-preparative HPLC (CH₃CN-H₂O, 55:45) to obtain racemic mixtures **158** (71.5 mg) and **160** (74.1 mg). Purification by chiral semi-preparative HPLC of racemic mixtures **157** (hexane-IPA, 60:40, v:v), **158** (hexane-IPA, 60:40) and **160** (hexane-IPA, 65:35) afforded (+)-**157** (79.9 mg), (-)-**157** (78.3 mg), (+)-**158** (27.0 mg), (-)-**158** (28.8 mg), (+)-**160** (19.2 mg) and (-)-**160** (16.7 mg) respectively. Fraction C (2.9 g) was submitted to silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 4:1-3:1, followed by MeOH) to afford racemic mixture **159** (400.2 mg). Part of the racemic mixture **159** (200.0 mg) was purified by chiral semi-preparative HPLC (hexane-IPA, 60:40) to afford (+)-**159** (81.0 mg) and (-)-**159** (79.4 mg). Fraction D was submitted to silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 4:1-3:1, followed by MeOH) followed by semi-preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20) to afford racemic mixture **161** (8.4 mg).

(+)-Balsaflavan G ((+)-**157**): yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{22} +8.58$ (c 2.5, Me₂CO); ECD (1.9×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{226} = -1.62$, $\Delta\epsilon_{239} = +1.12$, $\Delta\epsilon_{260} = -1.04$, $\Delta\epsilon_{287} = +2.00$; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 205 (4.60), 226 (4.43), 264 (4.22), 293 (4.15), 330 (3.67) nm; IR (film) ν_{max} 3352, 3027, 2925, 1703, 1612, 1513, 1450, 1367, 1264, 1225, 1171, 1149, 1091, 1028, 967, 926, 833, 744, 713, 628, 571, 540, 522 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR

spectroscopic data, see Tables 16 and 17; APCI(+)MS m/z 523 [M+H]⁺ (100), 271 (41), 133 (21); HRESIMS: m/z 545.1945 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₃H₃₀NaO₆, 545.1935).

(-)-Balsaflavan G ((-)-**157**): white crystals (IPA); mp 238 °C ; [α]_D²² -7.86 (c 1.3, Me₂CO); ECD (1.9×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{227} = +2.62$, $\Delta\epsilon_{240} = -1.42$, $\Delta\epsilon_{259} = +1.66$, $\Delta\epsilon_{286} = -2.46$; UV, IR, ¹H and ¹³C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as (+)-**157**.

(+)-iryatherin-D ((+)-**158**): yellow amorphous powder; [α]_D²⁵ +3.69 (c 0.22, Me₂CO); ECD (1.8×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{226} = -2.40$, $\Delta\epsilon_{237} = +1.55$, $\Delta\epsilon_{261} = -1.29$, $\Delta\epsilon_{287} = +2.18$; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 202 (4.52), 225 (4.31), 264 (4.19), 285 (4.09), 292 (4.09), 330 (3.53) nm; IR ν_{\max} 3356, 3027, 2927, 2837, 1889, 1700, 1611, 1512, 1448, 1425, 1368, 1236, 1176, 1150, 1106, 1090, 1035, 967, 926, 832, 685 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 16 and 17; APCI(+)MS m/z 553 [M+H]⁺ (100), 301 (41), 133 (10); HRESIMS m/z 575.2034 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₄H₃₂NaO₇, 575.2040).

(-)-iryatherin-D ((-)-**158**): yellow amorphous powder; [α]_D²³ -2.38 (c 0.29, Me₂CO); ECD (1.8×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{224} = +3.46$, $\Delta\epsilon_{239} = -1.64$, $\Delta\epsilon_{261} = +1.27$, $\Delta\epsilon_{285} = -2.16$; UV, IR, ¹H and ¹³C NMR, APCIMS and HRESIMS data were the same as (+)-**158**.

(+)-Balsaflavan H ((+)-**159**): yellow amorphous powder; [α]_D²⁶ +1.21 (c 0.84, Me₂CO); CD (1.3×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{225} = -1.46$, $\Delta\epsilon_{239} = +1.61$, $\Delta\epsilon_{259} = -0.57$, $\Delta\epsilon_{285} = +1.52$; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 205 (4.77), 225 (4.65), 271 (4.51), 285 (4.46), 330 (3.79); IR ν_{\max} 3391, 3025, 2919, 1887, 1700, 1620, 1589, 1515, 1444, 1370, 1220, 1172, 1144, 1120, 968, 833, 702, 624, 603, 567 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 16 and 17; APCI(+)MS m/z 553 [M+H]⁺ (100), 301 (74); HRESIMS m/z 575.2042 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₄H₃₂NaO₇, 575.2040).

(-)-Balsaflavan H ((-)-**159**): yellow amorphous powder; [α]_D²⁵ -0.99 (c 2.5, Me₂CO); ECD (1.0×10^{-3} M, MeOH) $\Delta\epsilon_{226} = +2.82$, $\Delta\epsilon_{239} = -2.34$, $\Delta\epsilon_{260} = +1.04$, $\Delta\epsilon_{285} = -2.21$; UV, IR, ¹H and ¹³C NMR, APCIMS and HRESIMS data were the same as (+)-**159**.

(+)-Balsaflavan I ((+)-**160**): yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{22} +50.43$ (c 1, Me₂CO); ECD (1.9×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{224} = -1.66$, $\Delta\epsilon_{233} = +0.46$, $\Delta\epsilon_{258} = -1.71$, $\Delta\epsilon_{286} = +0.80$; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 204 (4.65), 262 (4.32), 310 (4.24), 349 (4.11) nm; IR ν_{\max} 3375, 2921, 1699, 1624, 1547, 1512, 1448, 1419, 1350, 1232, 1171, 1156, 1089, 1041, 969, 834, 777, 745, 688, 620, 576, cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 16 and 17; APCI(+)-MS m/z 553 [M+H]⁺ (100), 301 (41), 133 (11); HRESIMS: m/z 543.1781 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₃H₂₈NaO₆, 543.1778).

(-)-Balsaflavan I ((-)-**160**): yellow powder; $[\alpha]_D^{24} -54.7$ (c 0.15, Me₂CO); ECD (1.9×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{224} = +1.28$, $\Delta\epsilon_{233} = -0.32$, $\Delta\epsilon_{260} = +1.71$, $\Delta\epsilon_{286} = -0.55$; UV, IR, ¹H, ¹³C NMR, APCIMS and HRESIMS data were the same as (+)-**160**.

Balsaflavan J (**161**): yellow powder; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): ; IR ν_{\max} 3356, 3027, 2928, 1620, 1545, 1512, 1443, 1352, 1290, 1230, 1169, 1148, 1120, 1049, 994, 968, 832; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 16 and 17; APCI(+)-MS: m/z 551 [M+H]⁺ (100), 299 (14); HRESIMS: m/z 573.1871 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₄H₃₀NaO₇, 573.1884).

X-ray diffraction crystal structure analysis of (-)-**157**

Diffraction intensity data were collected by a Bruker smart diffractometer equipped with an APEX II CCD detector employing graphite monochromated Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) at 100 K. The structure was solved by direct methods SHELXS-97 (Sheldrick 2008) and refined with full-matrix least-squares calculations on F² using SHELX-97 (Sheldrick 2008). Crystallographic data for compound (-)-**157** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center. Copies of these data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html or from the Cambridge Crystallographic Data Center, 12, Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. (fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Conformational analysis, geometrical optimization and ECD calculation for (2S,3S)-**157**, (2S,3S)-**158**, (2S,3S)-**159** and (2S,3S)-**160**

Monte Carlo Conformational searching was carried out by molecular mechanics using the MMFF94 force field with the Spartan '10 V1.1.0 program (Wavefunction Inc.). An energy cutoff of 5 kcal/mol was chosen in order to select a wide distribution of conformers. Selected conformers were submitted to single point energy calculation using DFT with the B3LYP function and 6-31G(d) basis set on the Gaussian 09 software. (Frisch et al. 2010) Geometry optimization followed by confirmation of the minimum nature of the structures by frequency calculations were carried out on conformers within an energy cutoff of 1 kcal/mol. Energies and rotational strengths calculations using the TD-DFT method with B3LYP function and 6-311G(2d,2p) basis set considering 40 electronic transitions were conducted for the optimized conformers. Effects of solvent (MeOH) were taken into account using the IEF-PCM model. ECD spectra were simulated from these data by overlapping Gaussian functions for each transitions according to:

$$\Delta\varepsilon(E) = \frac{1}{2.297 \times 10^{-39}} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \sum_i^A \Delta E_i R_i e^{-[(E-\Delta E_i)/(2\sigma)]^2}$$

where σ is the width of the band at 1/e height (set at 0.10-0.15) and ΔE_i and R_i are the excitation energies and rotatory strengths for transition i , respectively.

Bacterial Growth Inhibition Assay.

Antibacterial activity against *S. aureus* was evaluated using the microdilution method with modifications as reported previously (Banfi et al. 2003; Lavoie et al. 2013). The lowest concentration at which no growth was observed was defined as the minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC was evaluated after 24 hours. Gentamycin and Chloramphenicol were used as positive controls.

Cytotoxicity Assay.

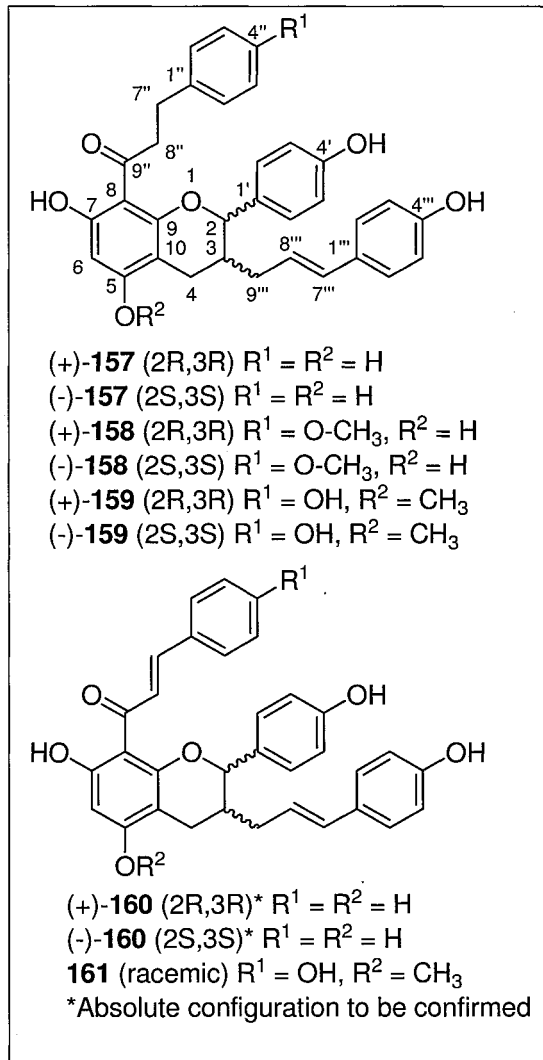
Cytotoxicity was evaluated against human fibroblast cell line WS1 using the resazurin reduction test reported previously (O'Brien et al. 2000; Bellila et al. 2011). Cytotoxicity was expressed as the concentration inhibiting 50 % of cell growth (IC_{50}). Etoposide was used as a positive control.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by NSERC (doctoral scholarship to FS) and by Fonds de recherche nature et technologies (doctoral scholarship to FS). This research has been enabled by the use of computing resources provided by WestGrid and Compute/Calcul Canada. The authors would like to thank F. Otis and N. Voyer from PROTEO and Université Laval for their help in recording circular dichroism spectra and C. Dusseault for its technical assistance in the evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity.

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary data associated with this article (^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **157-161**) are available free of charge via the Internet (annexe 2).

Figure 27: Structures of compounds **157-161**.

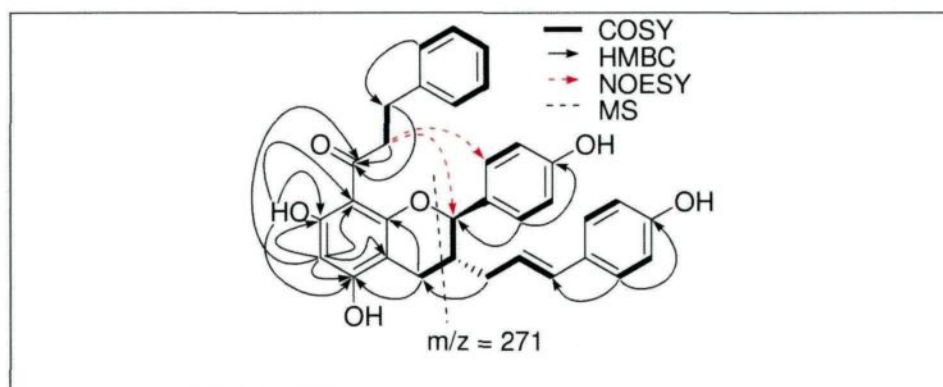


Figure 28: HMBC, COSY, NOESY and MS key data for identification of compound **157**.

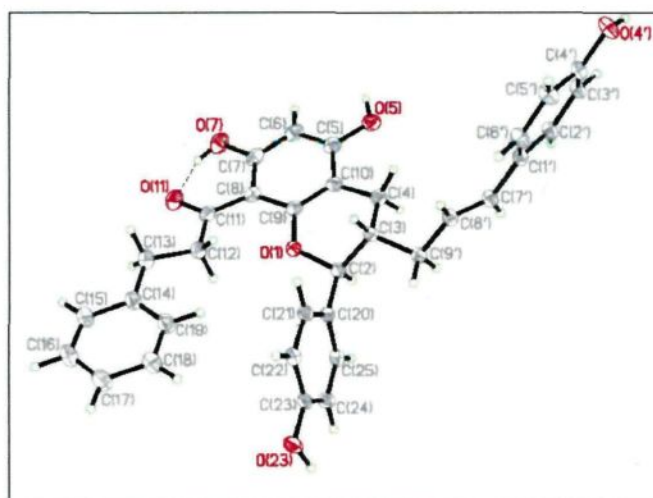


Figure 29: Single crystal X-ray structure of (-)-**157**.

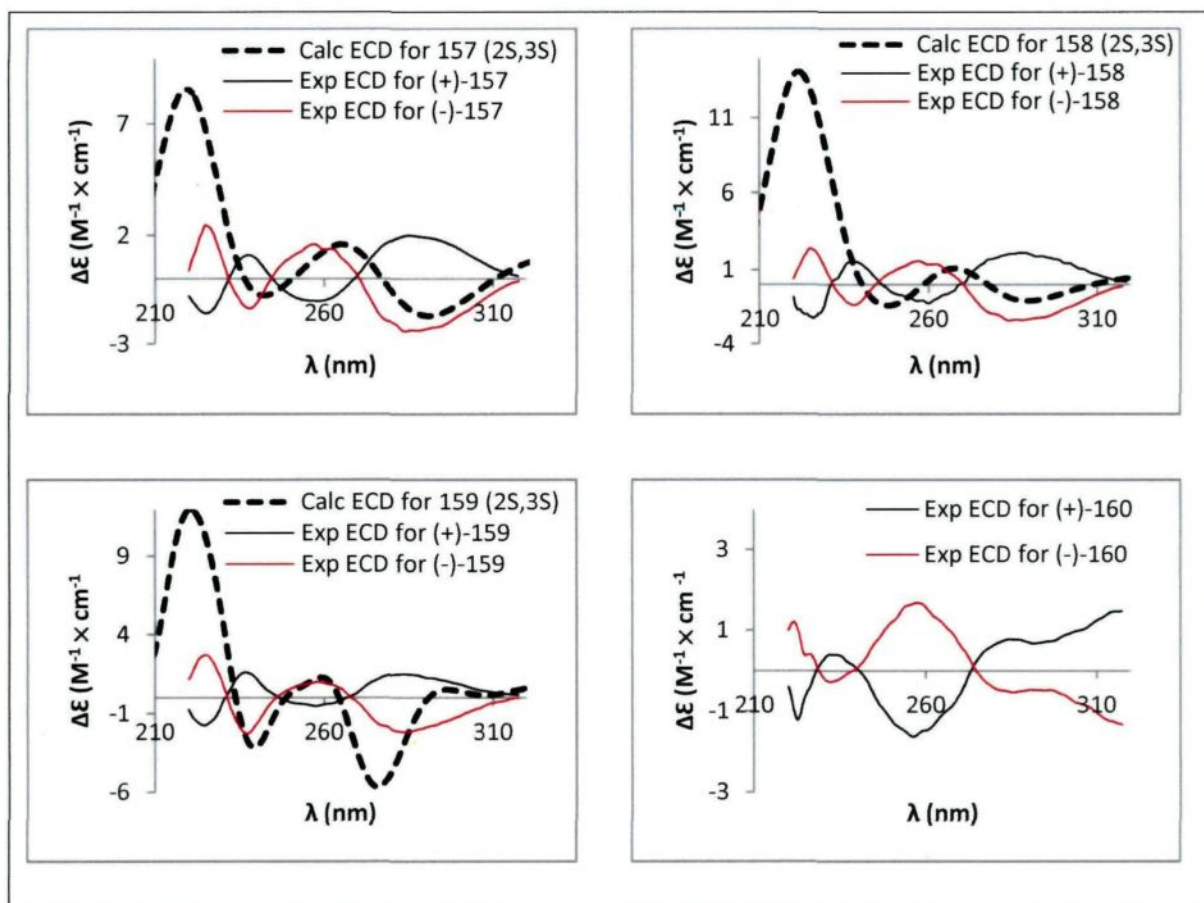


Figure 30: Experimental ECD spectra for compounds **157-159** and calculated (TDDFT at the B3LYP/6-311G(2d,2p) level) EDC spectra of compounds **157-(2S,3S)**, **158-(2S,3S)** and **159-(2S,3S)**.

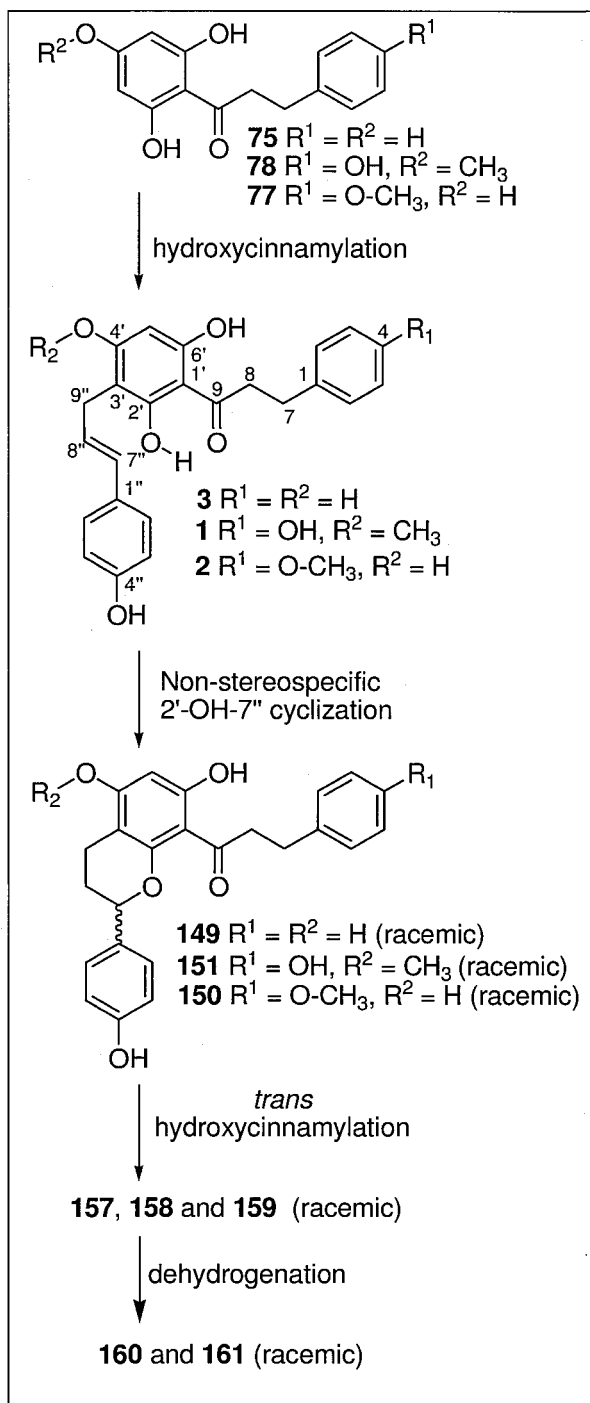


Figure 31: Proposed biosynthetic pathway

Table 16: ^1H NMR spectroscopic data for compounds **157** to **161** in acetone- d_6 (400 MHz)

	157	158	159	160	161
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
2	4.85, d (9.4)	4.85, d (9.3)	4.79, d (9.3)	4.85, d (9.4)	4.81, d (9.8)
3	2.29, m	2.26, m	2.24, m	2.23, m	2.36, m
4a	2.40, dd (16.3, 11.2)	2.30, dd (16.1, 10.9)	2.31, dd (16.2, 11.1)	2.41, m	2.34, m
4b	2.91, dd (16.2, 5.0)	2.91, dd (16.1, 4.6)	2.83, dd (16.0, 4.2)	2.98, m	2.91, m
6	6.02, s	6.02, s	6.08, s	6.07, s	6.10, s
2'	7.39, d (8.5)	7.41, d (8.4)	7.38, d (8.2)	7.53, d (8.4)	7.50, d (8.4)
3'	6.92, d (8.5)	6.94, d (8.4)	6.94, d (8.2)	7.04, d (8.5)	7.04, d (8.4)
2''	6.83, d (7.1)	6.71, s	6.62, s	7.06, d (8.1)	6.96, d (8.6)
3''	7.15, t (7.2)	6.71, s	6.62, s	7.26, m	6.78, m
4''	7.08, t (7.1)			7.29, m	
7''	2.82, dd (9.2, 7.7)	2.74, dd (9.5, 7.7)	2.71, dd (9.3, 7.6)	7.61, d (15.7)	7.61, d (15.5)
8''	3.17, m	3.12, m	3.12, m	8.04, d (15.7)	7.92, d (15.5)
2'''	7.23, d (8.7)	7.23, d (8.5)	7.22, d (8.2)	7.25, d (8.4)	7.26, d (8.6)
3'''	6.77, d (8.5)	6.77, d (8.5)	6.77, d (8.2)	6.77, d (8.6)	6.78, m
7'''	6.32, d (16.0)	6.31, d (15.7)	6.30, d (15.7)	6.33, d (15.8)	6.33, d (15.8)
8'''	6.04, m	6.05, m	6.03, m	6.05, m	6.07, m
9'''a	2.02, m	2.00, m	1.97, m	2.02, m	2.01, m
9'''b	2.19, m	2.19, m	2.17, m	2.23, m	2.22, m
7-OH	13.78, s	13.82, s	13.95, s	14.46, s	-
4''-O-CH3	-	3.74, s	-	-	-
5-O-CH3	-	-	3.83, s	-	3.88, s

Table 17: ^{13}C NMR of compounds **157** to **161** in acetone-d₆ (100 MHz)

	157	158	159	160	161
position	δ_c , type	δ_c , type	δ_c , type	δ_c , type	δ_c , type
2	84.2, CH	84.1, CH	84.0, CH	84.4, CH	84.3, CH
3	37.8, CH	37.7, CH	37.7, CH	37.4, CH	37.3, CH
4	26.0, CH ₂	26.0, CH ₂	26.0, CH ₂	26.4, CH ₂	26.4, CH ₂
5	163.2, C	163.2, C	164.5, C	163.7, C	164.7, C
6	96.2, CH	96.2, CH	92.8, CH	96.4, CH	93.1, CH
7	166.0, C	166.0, C	166.5, C	167.4, C	168.0, C
8	105.5, C	105.4, C	105.8, C	105.7, C	105.9, C
9	159.3, C	159.3, C	158.2, C	159.2, C	158.1, C
10	102.2, C	102.2, C	102.8, C	102.6, C	103.4, C
1'	131.0, C	131.1, C	130.9, C	131.0, C	130.9, C
2'	129.8, CH	129.9, CH	129.8, CH	130.4, CH	130.4, CH
3'	116.3, CH	116.4, CH	116.4, CH	116.6, CH	116.6, CH
4'	158.6, C	158.7, C	158.7, C	158.9, C	158.9, C
1''	142.2, C	133.9, C	132.6, C	136.3, C	127.9, C
2''	129.0, CH	129.8, CH	129.8, CH	129.1, CH	131.2, CH
3''	129.0, CH	114.3, CH	115.8, CH	129.6, CH	116.6, CH
4''	126.3, CH	158.7, C	156.1, C	130.6, CH	160.5, C
7''	31.1, CH ₂	29.9, CH ₂	30.3, CH ₂	142.6, CH	143.7, CH
8''	45.7, CH ₂	46.0, CH ₂	46.1, CH ₂	128.6, CH	125.2, CH
9''	205.3, C	205.4, C	205.9, C	192.9, C	193.2, C
1'''	132.6, C	130.1, C	130.1, C	130.1, C	130.1, C
2'''	128.2, CH	128.2, CH	128.1, CH	128.2, CH	128.2, CH
3'''	116.1, CH	116.1, CH	116.2, CH	116.1, CH	116.2, CH
4'''	157.6, C	157.6, C	157.6, C	157.6, C	157.6, C
7'''	132.6, CH	132.6, CH	132.6, CH	132.7, CH	132.7, CH
8'''	124.5, CH	124.5, CH	124.5, CH	124.4, CH	124.4, CH
9'''	36.2, CH ₂	36.2, CH ₂	36.2, CH ₂	36.2, CH ₂	36.2, CH ₂
5-O-CH ₃	-	-	56.2, CH ₃	-	26.3, CH ₃
4''-O-CH ₃	-	55.3, CH ₃	-	-	-

Table 18. Antibacterial activity and cytotoxicity of compounds 157-161

Compounds	Antibacterial activity	Cytotoxicity
	MIC (μM) ^a <i>S. aureus</i>	IC ₅₀ (μM) ^b WS1
157	12.5	32 ± 3
(+)-157	3.13	33 ± 7
(-)-157	3.13	15 ± 2
158	6.25	> 50
(+)-158	25.0	14 ± 6
(-)-158	25.0	7.4 ± 0.6
159	> 50	45 ± 3
(+)-159	12.5	19 ± 2
(-)-159	6.25	16 ± 3
160	3.13	36 ± 3
(+)-160	3.13	17 ± 3
(-)-160	1.56	8 ± 1
161	3.13	39 ± 2
Chloramphenicol	0.94	ND
Gentamycin	0.020	ND
Etoposide	ND	23 ± 3

^aMinimal Inhibitory Concentration of *S. aureus* growth after 24 hours.

^bConcentration inhibiting the growth of fifty percent of human skin fibroblasts WS1 growth after 48 hours. Mean ± SD (n=3).
ND, not determined

CHAPITRE 8

ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES BALSACONES P À W

INTRODUCTION

Ce chapitre présente une section résultats et discussion ainsi qu'une section expérimentale rédigées selon la forme exigée dans la plupart des journaux scientifiques du domaine des produits naturels. Ces résultats pourront ainsi être facilement intégrés à un article dont la préparation sera poursuivie après le dépôt de cette thèse. L'isolement de huit nouvelles balsacones (P-W) est décrit ainsi que la détermination de leurs structures grâce à l'analyse des données spectrales obtenues par RMN 1D et 2D, par spectroscopie infrarouge et par spectrométrie de masse. Tous les balsacones isolées étaient racémiques et quatre d'entre elles (T-W) ont été purifiées par HPLC sur un support chiral ce qui a permis d'obtenir les paires d'énantiomères de ces 4 mélanges. Des analyses expérimentales de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur ces énantiomères. Des calculs seront bientôt entrepris pour générer des spectres de dichroïsme circulaire théorique et les comparer avec les spectres expérimentaux avec comme objectif d'arriver à déterminer la configuration absolue des ces énantiomères. L'activité antibactérienne et la cytotoxicité des composés racémiques isolés ont été évaluées *in vitro* contre *S. aureus* et une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1) respectivement.

RESULTS AND DISCUSSION

Structural determination

Fractionation of *P. baslamifera* bud ethanolic extract by liquid-liquid extractions, silica gel column chromatography and reversed phase flash chromatography followed by preparative HPLC purification yielded compounds **162-169**.

Balsacone P (**162**) was isolated as a reddish powder, and its molecular formula was established as $C_{33}H_{30}O_6$ based on the $[M+Na]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 545.1943 (calcd for $C_{33}H_{30}O_6Na$, 545.1935) in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3348 and 1598 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and 1H NMR data (table 19) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, five oxygenated aromatic quaternary carbons, five aromatic quaternary carbons, ten sp^2 methines, two sp^3 methines and four methylenes. Detailed analysis of 1D 1H , 2D-COSY and HSQC experiments showed signals for two 1,4-disubstituted aromatic rings at δ_H 7.29 (2H, m, H-B2), 6.90 (2H, d, 8.6 Hz, H-B3), 7.23 (2H, d, 8.6 Hz, H-E2) and 6.77 (2H, d, 8.6 Hz, H-E3) and one monosubstituted aromatic ring at δ_H 7.28 (2H, m, H-D2), 7.27 (2H, m, H-D3) and 7.17 (1H, m, H-D4). The other coupling systems observed on the COSY spectrum (one $AA'X_2$, one $AA'MX$ and one allyl) were reminiscent of balsacone L (**157**) previously isolated from *P. balsamifera* buds (not yet published, Chapitre 7). Indeed, 1H and ^{13}C NMR spectra of **162** showed signals accounting for a flavan skeleton substituted by a 4-hydroxycinnamyl moiety in position 3 of ring C and a dihydrocinnamoyl moiety. The discrepancies between the spectral data of **162** and balsacone L (**157**) were attributed to a different position for the dihydrocinnamoyl moiety on ring A. HMBC correlations of δ_C 162.3 (C-A9) with δ_H 4.79 (1H, d, 8.8 Hz, H-C2), δ_H 2.33 (1H, dd, 16.3, 10.3 Hz, H-C4a), δ_H 2.84 (1H, dd, 16.3, 4.7 Hz, H-C4b) and δ_H 5.94 (1H, s, H-A8) and of δ_C 205.5 with H-A8 indicated that the dihydrocinnamoyl moiety was attached at position 6 of ring A compared to position 8 for balsacone L (**157**). Based on these observations, balsacone P (**162**) was characterized as 6-dihydrocinnamoyl-3-(4-hydroxycinnamyl)-5,7,4'-trihydroxyflavan.

Balsacone Q (**163**) was isolated as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{43}H_{40}O_8$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 685.2778 (calcd for $C_{43}H_{40}O_9$, 685.2796) in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3335 and 1610 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and 1H data (table 19) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, seven oxygenated aromatic quaternary carbons, seven aromatic quaternary carbons, twelve sp^2 methines, two sp^3 methines and five methylenes. Spectral data of compound **163** showed many similarities with iryantherin-D (**158**) which was recently identified in *P. balsamifera* buds (chapitre 7, not yet published). Indeed, signals accounting for a flavan skeleton bearing a 4-methoxydihydrocinnamoyl moiety in 8 and a 4-hydroxycinnamyl moiety in 3 were present in the 1H and ^{13}C NMR spectra of **163**. Only the signal corresponding to the hydrogen in position 6 of the flavan skeleton was missing, thus suggesting the presence of an additional substituent at this position. Furthermore, detailed analysis of 1D 1H , 2D-COSY and HSQC experiments (figure 33) also showed the presence of a 1,4-disubstituted aromatic ring at δ_H 7.16 (2H, d, 8.2 Hz, H-F2) and 6.74 (2H, d, 8.2 Hz, H-F3) and a *trans*-allyl at δ_H 6.36 (1H, d, 15.7 Hz, H-F7), 6.17 (1H, m, H-F8) and 3.52 (2H, d, 5.7 Hz, H-F9). HMBC correlations of δ_C 127.9 with H-F7 and of δ_C 157.3 with H-F2 indicated that this 1,4-disubstituted aromatic ring was oxygenated and linked to the allyl thus resulting in another 4-hydroxycinnamyl moiety. The attachment of this moiety at position 6 of the flavan skeleton was confirmed by the HMBC correlations of δ_C 161.3 (C-A5) and δ_C 163.5 (C-A7) with H-F9. The exact substitution pattern on ring A of the flavan skeleton was also based on the following HMBC correlations: δ_C 157.4 with δ_H 4.76 (1H, d, 9.6 Hz, H-C2), 2.46 (1H, dd, 16.0, 11.0 Hz, H-C4a) and 2.96 (1H, dd, 16.0, 4.7 Hz, H-C4b); C-A5 with H-C4a and H-C4b. Based on the above evidences, balsacone Q (**163**) was characterized as 8-dihydrocinnamoyl-3-(4-hydroxycinnamyl)-6-(4-hydroxycinnamyl)-5,7,4'-trihydroxyflavan.

Balsacone R (**164**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{42}H_{38}O_8$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 671.2624 (calcd $C_{42}H_{39}O_8$, 671.2639) in the

HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3337 and 1612 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and ^1H data (table 19) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, six oxygenated aromatic quaternary carbons, seven aromatic quaternary carbons, eleven sp^2 methines, four sp^3 methines and five methylenes. Detailed analysis of 1D ^1H , 2D-COSY and HSQC experiments (figure 34) showed the presence of three 1,4-disubstituted aromatic rings (B, E, and F, table 19) and one monsubstituted aromatic ring (D, table 19). As shown by HMBC correlations (figure 34) of δ_{C} 131.4 (C-E7) and δ_{C} 156.6 (C-E4) with δ_{H} 7.11 (2H, m, H-E2), one of the 1,4-disubstituted aromatic rings was oxygenated and linked to an allyl coupling systems thus resulting in a 4-hydroxycinnamyl unit. Also, the monsubstituted aromatic ring was implicated in a dihydrocinnamoyl unit in the same manner as for **162** (figure 34). The two remaining 1,4-disubstituted aromatic rings were linked to AA'BX and AA'MX coupling systems respectively at δ_{H} 2.31 (1H, m, H-C4a), 2.75 (1H, m, H-C4b), 2.28 (1H, m, H-C3), 4.82 (1H, d, 9.2 Hz, H-C2), 2.48 (1H, m, H-F9a), 2.60 (1H, dd, 16.2 and 4.6 Hz, H-F9b), 3.97 (1H, m, H-F8) and 4.88 (1H, d, 8.8 Hz, H-F7). The AA'BX system was reminiscent of the signals accounting for the 3,4-dihydro-2H-pyran ring C in **162** and **163** thus suggesting the presence of the same flavan skeleton. The AA'MX system was proposed to complete another 3,4-dihydro-2H-pyran ring but oxygenated in position F8 as shown by the deshielded chemical shift of C-F8 (table 19). HMBC correlations of δ_{C} 157.9 (C-A5) with H-C4a, H-C4b, H-F9a, H-F9b and H-F7, of δ_{C} 100.6 (C-A10) with H-C4a and H-C4b and of δ_{C} 100.1 (C-A6) with H-F9a and H-F9b indicated that this second 3,4-dihydro-2H-pyran ring was fused with ring A of the flavan skeleton resulting in a 3,4-dihydro-2H-pyranoflavan skeleton with a 4-hydroxyphenyl group in position F7. The signal of a chelated phenolic proton at δ_{H} 14.24 (1H, s, A7-OH) was observed on the ^1H NMR spectrum, and it was determined that this phenol was situated on ring A based on HMBC correlations of C-A6, 104.0 (C-A8) and 161.4 (C-A7) with C-A7-OH. The carbonyl of the dihydrocinnamoyl unit was considered to be responsible for the chelation of this phenolic group through hydrogen bonding. Therefore, the dihydrocinnamoyl unit was also attached to ring A on the final available position. It also indicated that the chelated phenol was in *ortho* position of the dihydrocinnamoyl unit since hydrogen bonding would not be

possible if they were *para* of each other (Van der Schyf et Mabic 2004). Finally, it was determined that the remaining 4-hydroxycinnamyl unit was attached in position C3 of the 3,4-dihydro-2*H*-pyranoflavan skeleton as shown by HMBC correlations of δ_C 35.9 (C-C3) with δ_H 1.98 (1H, m, H-E9a). A NOESY correlation between δ_H 7.36 (2H, d, 8.4 Hz, H-B2) and 3.20 (2H, m, H-D8) confirmed that ring C was fused in *ortho* position of the dihydrocinnamoyl unit thus resulting in the complete assignment for balsacone R (**164**) presented in table 19.

Balsacone S (**165**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{43}H_{40}O_9$ based on the $[M+Na]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 723.2562 (calcd $C_{43}H_{40}O_9Na$, 723.2562) in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3370 and 1611 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and 1H NMR data (table 19) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, eight oxygenated aromatic quaternary carbons, seven aromatic quaternary carbons, ten sp^2 methines, four sp^3 methines and five methylenes. Spectral NMR data of **165** were very similar to those of **164** except for the presence of an additional signal at δ_H 3.74 (3H, s, D4-OCH₃) corresponding to a methoxy group and the presence of a fourth 1,4-disubstituted aromatic ring instead of the monosubstituted ring present in **164**. HMBC correlations of δ_C 158.6 (C-D4) with D4-OCH₃ and δ_H 6.72 (4H, s, H-D2 and H-D3) revealed that the additional methoxy group was at C-D4 resulting in the structure presented in figure 32 for balsacone S (**165**).

Balsacone T (**166**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{51}H_{45}O_8$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 787.3245 (calcd $C_{51}H_{46}O_8$, 787.3265) in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3216 and 1598 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and 1H NMR data (table 20) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, seven oxygenated aromatic quaternary carbons, eight aromatic quaternary carbons, fifteen sp^2 methines, four sp^3 methines and six methylenes. Detailed analysis of 1D 1H , 2D-COSY and HSQC experiments (figure 35) showed the presence of four 1,4-disubstituted

aromatic rings (B, E, F and G, table 20) and one monosubstituted aromatic ring (D, table 20). As shown by HMBC correlations (figure 35) of δ_c 132.6 (C-G7) with δ_H 7.22 (2H, d, 8.4 Hz, H-G2) and of δ_c 132.7 (C-E7) with δ_H 7.12 (2H, m, H-E2), two of the 1,4-disubstituted aromatic rings were linked to allyl coupling systems thus resulting in two 4-hydroxycinnamyl units. Also, the monosubstituted aromatic ring was implicated in a dihydrocinnamoyl unit in the same manner as for **164**. The two remaining 1,4-disubstituted aromatic rings were both linked to very similar AA'BX coupling systems at δ_H 2.31 (1H, m, H-C4a), 2.75 (1H, m, H-C4b), 2.28 (1H, m, H-C3), 4.82 (1H, d, 9.2 Hz, H-C2), 2.48 (1H, m, H-F9a), 2.60 (1H, dd, 16.2 and 4.6 Hz, H-F9b), 3.97 (1H, m, H-F8) and 4.88 (1H, d, 8.8 Hz, H-F7). Signals accounting for these two AA'BX coupling systems suggested the presence of the same 3,4-dihydropyranoflavan skeleton substituted by a 4-hydroxyphenyl group in position F7 as in compound **164** and **165**. Discrepancies between the signals of the 3,4-dihydropyran ring F were attributed to the absence of the hydroxyl in position F8. The two remaining 4-hydroxycinnamyl units were found to be attached at C3 and F8 of the 3,4-dihydropyranoflavan skeleton as shown by HMBC correlations of δ_c 37.8 with δ_H 2.03 (1H, m, H-E9a) and of δ_c 83.6 (C-F7) with δ_H 2.03 (1H, m, H-G9a) and δ_H 2.19 (1H, m, H-G9b). The signal of a chelated phenolic proton at δ_H 14.24 (1H, s, A7-OH) was also observed on the ^1H NMR spectrum of **166** indicating the presence on ring A of a phenol and the dihydrocinnamoyl unit in position A7 and A8 respectively. A 2D NOESY correlation between δ_H 7.36 (2H, d, 8.4 Hz, H-B2) and 3.20 (2H, m, H-D8) allowed to determine which of the two pyran rings was next to the dihydrocinnamoyl unit (figure 35) resulting in the assignment presented in table 20 for balsacone T (**166**).

Balsacone U (**167**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $\text{C}_{51}\text{H}_{46}\text{O}_8$ based on the $[\text{M}+\text{H}]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 787.3229 (calcd $\text{C}_{51}\text{H}_{47}\text{O}_8$, 787.3265) in the HRMS spectrum. Spectral data of **167** (^1H , ^{13}C , IR, MS) were very similar to those of **166** and a detailed analysis of 2D-COSY, HSQC, HMBC and 2D-NOESY experiments did not allow to differentiate the two compounds suggesting that they probably were diastereomers.

Balsacone V (**168**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{52}H_{48}O_9$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 817.3370 (calcd $C_{52}H_{48}O_9$, 817.3371) in the HRMS spectrum. The IR spectrum showed bands at 3265 and 1608 cm^{-1} , due to phenol and carbonyl functions respectively. The ^{13}C and 1H NMR data (table 20) along with information from Dept 135 and HSQC spectra indicated the presence of one carbonyl, eight oxygenated aromatic quaternary carbons, eight aromatic quaternary carbons, fourteen sp^2 methines, four sp^3 methines, six methylenes and one methoxy. Spectral data of **168** were very similar to those of **166** except for the presence of an additional signal at δH 3.73 (3H, s, D4-OCH₃) corresponding to a methoxy group and the presence of a fifth 1,4-disubstituted aromatic ring instead of the monosubstituted aromatic ring found in **166**. HMBC correlations of δC 158.7 (C-D4) with D4-OCH₃ and δH 6.71 (4H, s, H-D2 and H-D3) revealed that the additional methoxy group was at C-D4 resulting in the structure presented in figure 32 for balsacone V (**168**).

Balsacone W (**169**) was obtained as a brownish powder, and its molecular formula was established as $C_{52}H_{48}O_9$ based on the $[M+H]^+$ quasimolecular ion peak at m/z 817.3391 (calcd $C_{52}H_{48}O_9$, 817.3371) in the HRMS spectrum. Spectral data of **169** (1H , ^{13}C , IR, MS) were very similar to those of **168** and a detailed analysis of 2D-COSY, HSQC, HMBC and 2D-NOESY experiments did not allow to differentiate the two compounds suggesting that they probably were diastereomers.

Since other balsacones were previously isolated as racemic mixtures (not yet published manuscript, chapitres 5, 6 et 7), compounds isolated in this work were submitted to chiral analytical HPLC. The presence of two enantiomers was detected for **163-169**. Compound **162** could not be separated on the chiral support used in this work but the absence of CE on its ECD spectrum indicated it was also racemic. Chiral semi-preparative HPLC purifications yielded both enantiomers of the racemic mixtures **166-169**. Relative configuration of **162** and **163** was established as *trans* C-C2,C-C3 based on the $J_{C-C2,C-C3}$ coupling constants of 8.8 and 9.6 Hz respectively. In the case of compounds **164-169**, relative configurations of C-C2,C-C3 and C-F7,C-F8 were also found to be *trans* based on $J_{C-C2,C-C3}$ and $J_{C-F7,C-F8}$ ranging between 6.3 and 9.6 ppm thus

indicating 4 possible isomers for each compound. As mentioned earlier, **166** and **167** as well as **168** and **169** were believed to be diastereomers. In an attempt to elucidate the absolute configurations of the isolated enantiomers, ECD spectra were recorded (figure 36). Without available data on similar compounds, it was impossible to determine their absolute configurations based solely on these experimental ECD data. Computational calculations are currently ongoing in our lab to simulate the ECD spectra of enantiomers from compounds **166-169**. Comparison of these calculated spectra with the experimental ones should allow to determine the absolute configurations of isolated enantiomers. Although NMR data did not allow to differentiate structures of **166** from **167** and **168** from **169**, discrepancies were observed on ECD spectra of the respective enantiomers obtained from these racemic mixtures. For example, the ECD spectra of (-)-**166** showed a weak negative CE at 218 nm while that of (-)-**167** showed a strong positive CE around the same wavelength (figure 36) thus reinforcing the hypothesis that they were diastereomers. Again, ECD spectra calculations should confirm this hypothesis by establishing their absolute configuration.

Proposed biosynthetic pathway

It was proposed in our previous work that the benzo-3,4-dihydro-2*H*-pyran ring of balsacones originated from intramolecular cyclization of 3'-hydroxycinnamyl-2',4',6'-dihydrochalcone (not yet published, chapitre 5). In the case of **162**, this cyclization would occur between the phenol *para* of the dihydrocinnamoyl moiety and C-C2 of the hydroxycinnamyl unit. The cyclization would be followed by an hydroxycinnamylation in position C3. For compound **163-169**, the formation of the 3,4-dihydro-2*H*-pyran ring would rather be the result of an intramolecular cyclization between the phenol *ortho* of the dihydrocinnamoyl moiety and C-C2 of the hydroxycinnamyl unit. Two successive hydroxycinnamylation in C-C3 and C-A6 would explain the formation of **163**. Another intramolecular cyclization between the phenol in C-A5 and C-D7 followed by an hydroxylation at C-D8 would yield **164**. Substitution of the hydroxyl at C-D8 by another hydroxycinnamyl unit would explain the formation of **166**. Finally, the same pathway but starting from 4-methoxy-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone as a precursor would yield **165**, **168** and **169**.

Antibacterial activity and cytotoxicity of isolated compounds

Antibacterial activity of racemic mixtures **162-169** was evaluated against *S. aureus*. Compound **163** and **164** showed the strongest antibacterial activity with MIC of 6.25 μM for both compounds (table 21). Compound (\pm)-**165** showed weaker activity with a MIC of 50.0 μM while all other isolated compounds were found inactive within the tested concentrations. Evaluation of the antibacterial activity of isolated enantiomers is in progress. Finally, no cytotoxicity was detected for **163** and **164** at the concentration tested (table 21) which is essential for further pharmaceutical development.

EXPERIMENTAL

General

Absorption UV-Vis spectra were recorded using an Agilent 8453 diode-array spectrophotometer. ECD spectra were measured on a Jasco J-815 ECD spectrometer. FTIR spectra were recorded on a Perkin-Elmer SpectrumOne (neat, thin films on NaCl plates). The 1D and 2D NMR spectra (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC and HMBC) were performed using an Avance 400 Bruker spectrometer (400.13 MHz for ^1H , 100.61 MHz for ^{13}C spectra) equipped with a 5 mm QNP probe. Spectra were acquired in acetone- d_6 unless otherwise specified and chemical shifts were reported in ppm (δ) relative to TMS. High resolution ESI spectra were recorded on an Agilent Technology 6210 TOF MS system. Protonated molecular ions ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ and/or sodium adducts ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ were used for empirical formula confirmation. APCI MS (positive mode) spectrum were obtained with an Agilent 1100 series HPLC equipped with an Agilent G1946 VL Mass Selective Detector in positive mode at 70 eV. Column used for HPLC-APCI MS analysis was an Inerstil Prep ODS column (6 \times 250 mm, 10 μm). Semi-preparative HPLC was carried out on an Agilent 1100 HPLC series with an Inerstil Prep ODS column (20 \times 250 mm, 10 μm) and Chiral semi-preparative HPLC with a tris-(3,5-dimethylphenyl)carbonyl amylose chiral coated column (RegisPack $^{\text{TM}}$, 10 \times 250 mm, 5 μm). Reversed phase flash chromatography was conducted on a Biotage Flash+ system using a C18 40iM cartridge (carbon loading 17 %, 135 g) from Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada). Reagents and analytical grade

solvents were purchased from VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada) and were used as received. Ultra pure Silica gel (40-63 μm) and glass TLC plates (40-63 μm with F_{254} indicator) were supplied by Silicycle Inc. (Ville de Québec, Québec, Canada).

Plant material

Buds from different trees of *P. balsamifera* were collected in March 2005 near Chicoutimi, Québec province, Canada. The plant was authenticated by Mr. Patrick Nadeau (Université du Québec à Chicoutimi) and a voucher specimen (No. 499678) was deposited at the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec City, Canada. After collection, buds were kept frozen until extraction.

Extraction and isolation

Compounds 162, 163, 166-169.

Frozen Buds were coarsely ground using an electrical blender. The resulting crude resinous material (2.69 kg) was divided between two flasks and extracted 4 times (3 h each time) with a total of 6 L of 95 % EtOH under reflux. Extracts were combined and concentrated to a resinous residue using a rotary evaporator. Part of this residue (1.00 kg) was suspended in MeOH and washed with hexane. The concentrated MeOH residue was suspended in Et₂O and treated with water. The concentrated Et₂O phase was submitted to silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 1:0, 80:1, 40:1, 20:1, 10:1, 0:1) yielding 6 fractions (A-F). Fraction D (112.0 g) was submitted to another silica gel CC (CH₂Cl₂-EtOAc, 10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, followed by MeOH) to afford 8 subfractions (D1-D8). Subfraction D1 (3.80 g) was refractionated on silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 7:1, 5:1, 2:1, followed by MeOH) to afford 5 subfractions (D1a-D1e). Subfraction D1c (959.6 mg) was purified by preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20, flow rate 10 ml/min) to afford racemic **162** (129.0 mg). Subfraction D4 (3.55 g) was submitted to reversed phase C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 95:5, 0:100) yielding 9 more subfractions (D4a-D4i). Subfraction D4g (1.69 g) was submitted to preparative HPLC (MeOH-H₂O, 80:20 → 100:0, 30 min, flow rate 10 ml/min) to afford

impure **163** (159.1 mg) which was repurified by preparative HPLC (CH₃CH-H₂O, 60:40, flow rate 10 ml/min) yielding racemic **163** (50.5 mg). Subfraction D5 (6.64 g) was refractionated by reversed phase C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 70:30, 75:25, 80:20, 90:10, 100:0) to afford 8 subfractions (D5a-D5h). Subfraction D5g (570.9 mg) was submitted to preparative HPLC purification (CH₃CN-H₂O, 60:40, 20 ml/min) yielding racemic **166** (15.8 mg) and **167** (22.8 mg). Both racemic mixture were separated by chiral semi-preparative HPLC (Hexane-IPA, 60:40, flow rate 4 ml/min) yielding **166a** (7.3 mg), **166b** (3.2 mg), **167a** (3.1 mg) and **167b** (4.2 mg). Fraction D7 (3.34 g) was refractionated over reversed phase C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 50:50, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5, 100:0) yielding 13 subfractions (D7a-D7m). Subfraction D7l (211.2 mg) was purified by semi-preparative HPLC (CH₃CN-H₂O, 60:40, flow rate 10 ml/min) to yield racemic **168** (18.5 mg) and **169** (21.3 mg). Both racemic mixtures were separated by chiral semi-preparative HPLC (Hexane-IPA, 60:40, flow rate 4 ml/min) to afford **168a** (4.5 mg), **168b** (5.5 mg), **169a** (2.5 mg) and **169b** (6.8 mg).

Compounds 164 and 165

Buds previously immersed in liquid nitrogen were coarsely ground in an electrical blender. The obtained residue (1.04 kg) was extracted with refluxing 95 % EtOH (5 times, 5h, 2.5L). The combined extracts were concentrated using a rotary evaporator, suspended in MeOH and washed with hexanes. After concentration of the MeOH phase using a rotary evaporator, the obtained residue was resuspended in Et₂O and extracted with H₂O. The Et₂O phase was dried to obtained a crude extract (355.1 g) which was fractionated by silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 40:1, 20:1, 10:1, 0:1) yielding 7 fractions (A-G). Fraction F (59.5 g) was submitted to another silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 0:1) to afford 6 subfractions (F1-F6). Subfraction F4 (45.6 g) was refractionated by reversed phase C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 65:35, 70:30, 72:28, 0:100) yielding subfractions F4a to F4e. Subfraction F4c (2.93 g) was submitted to another silica gel CC (CHCl₃-EtOAc, 4:1-3:1, followed by MeOH) to afford 9 subfractions (F4c.I-F4c.X). Subfraction F4c.III (379.5 mg) was purified by silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 30:1 followed by MeOH) followed

by preparative HPLC (MeOH + 0.1 % HCOOH-H₂O + 0.1 % HCOOH, 71:29, flow rate 10 ml/min) to afford **164** (9.2 mg). Subfraction F4c.IX was purified by silica gel CC (CHCl₃-MeOH, 30:1, 20:1, followed by MeOH), reversed phase C18 flash chromatography (MeOH-H₂O, 80:20, 100:0) and by two successive preparative HPLC separations (MeOH-H₂O, 73:27 and CH₃CN-H₂O, 50:50, flow rate 10 ml/min) to afford **165** (7.3 mg).

Physical data of new compounds

Balsacone P (**162**): Reddish powder; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 204 (4.54), 273 (4.24), 290 (4.21); IR ν_{\max} 3348, 2963, 1598, 1513, 1438, 1261, 1090, 1030, 799, 701 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 19; APCIMS: m/z 523 [M+H]⁺ (100), 271 (7.8) ; HRESIMS: m/z 545.1943 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₃H₃₀O₆Na, 545.1935).

Balsacone Q (**163**): Brownish powder;; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 203 (4.72), 223 (4.59), 272 (4.35); IR ν_{\max} 3335, 2963, 1610, 1512, 1446, 1260, 1093, 1030, 799 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 19; APCIMS: m/z 685 [M+H]⁺ (64), 433 (19), 401 (14); HRESIMS: m/z 685.2778 [M+H]⁺ (calcd for C₄₃H₄₀O₉, 685.2796).

Balsacone R (**164**): Brownish powder; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 202 (4.51), 262 (4.02), 296 (3.96); IR ν_{\max} 3337, 2926, 1700, 1612, 1516, 1447, 1423, 1379, 1360, 1264, 1235, 1149, 1132, 1072, 1056, 1023, 834 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 19; APCIMS: m/z 671 [M+H]⁺ (7), 535 (7), 419 (100), 283 (14); HRESIMS: m/z 671.2624 [M+H]⁺ (calcd for C₄₂H₃₉O₈, 671.2639).

Balsacone S (**165**): Brownish powder; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 205 (4.65), 224 (4.56), 272 (4.26), 296 (4.26); IR ν_{\max} 3370, 2924, 1698, 1611, 1513, 1446, 1426, 1377, 1242, 1152, 1130, 1061, 1031, 831 cm⁻¹; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 19; APCIMS: m/z 701 [M+H]⁺ (5), 565 (9), 449 (100); HRESIMS: m/z 723.2562 [M+Na]⁺ (calcd C₄₃H₄₀O₉Na, 723.2562).

Balsacone T1 (**166a**): Brownish powder; ECD (c 1.3 × 10⁻³ M, MeOH): $\Delta\epsilon_{231} = -8.5$, $\Delta\epsilon_{283} = -1.9$, $\Delta\epsilon_{300} = -2.4$; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 208 (4.87), 264 (4.59), 296 (4.47); IR ν_{\max} 3216, 2962, 1598, 1510, 1414, 1260, 1089, 1030,

799 cm^{-1} ; For ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table 20; APCIMS: m/z 787 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (47), 534 (23)
 HRESIMS: m/z 787.3245 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{46}\text{O}_9$, 787.3265).

Balsacone T2 (**166b**): Brownish powder; ECD (c 4.1×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{218} = -1.1$, $\Delta\epsilon_{233} = 5.7$, $\Delta\epsilon_{258} = 0.93$,
 $\Delta\epsilon_{283} = -1.6$, $\Delta\epsilon_{298} = -2.25$; UV, IR, ^1H , ^{13}C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as **166a**.

Balsacone U1 (**167a**): Brownish powder; ECD (c 3.9×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{236} = -2.8$, $\Delta\epsilon_{255} = 0.72$, $\Delta\epsilon_{279} = 1.1$,
 $\Delta\epsilon_{304} = 1.6$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 201 (5.04), 265 (4.59), 296 (4.49); IR ν_{max} 3239, 2960, 1608, 1512, 1444, 1362,
 1260, 1091, 1029, 799 cm^{-1} ; For ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table 20; APCIMS: m/z 787 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 (54), 535 (40) HRESIMS: m/z 787.3229 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{47}\text{O}_9$, 787.3265).

Balsacone U2 (**167b**): Brownish powder; ECD (c 2.7×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{236} = 5.62$, $\Delta\epsilon_{255} = -0.73$, $\Delta\epsilon_{277} = -1.3$,
 $\Delta\epsilon_{305} = -2.5$; UV, IR, ^1H , ^{13}C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as **167a**.

Balsacone V1 (**168a**): Brownish powder; ECD (c 2.8×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{230} = -8.5$, $\Delta\epsilon_{260} = -1.5$, $\Delta\epsilon_{282} = 2.7$,
 $\Delta\epsilon_{302} = 3.3$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 202 (5.06), 264 (4.68), 295 (4.55); IR ν_{max} 3265, 1608, 1511, 1444, 1417, 1260,
 1091, 1026, 798 cm^{-1} ; For ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table 20; APCIMS: m/z 817 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (17),
 565 (12) HRESIMS: m/z 817.3370 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{O}_9$, 817.3371).

Balsacone V2 (**168b**): Brownish powder; ECD (c 3.7×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{232} = 6.3$, $\Delta\epsilon_{261} = 0.94$, $\Delta\epsilon_{283} = -1.9$,
 $\Delta\epsilon_{302} = -2.5$; UV, IR, ^1H , ^{13}C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as **168a**.

Balsacone W1 (**169a**): Brownish powder; ECD (c 3.1×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{233} = -4.2$, $\Delta\epsilon_{256} = -0.83$, $\Delta\epsilon_{261} = -0.63$,
 $\Delta\epsilon_{282} = 1.6$, $\Delta\epsilon_{300} = 2.2$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 203 (4.81), 269 (4.39), 295 (4.31); IR ν_{max} 3240, 2959, 1608, 1511,
 1442, 1259, 1093, 1028, 800 cm^{-1} ; For ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table 20; APCIMS: m/z 817
 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (28), 565 (17), 391 (100); HRESIMS: m/z 817.3391 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{O}_9$, 817.3371).

Balsacone W2 (**169b**): Brownish powder; ECD (c 3.6×10^{-3} M, MeOH): $\Delta\epsilon_{231} = 4.3$, $\Delta\epsilon_{257} = 1.3$, $\Delta\epsilon_{261} = 1.3$,
 $\Delta\epsilon_{282} = -0.63$, $\Delta\epsilon_{301} = -0.76$; UV, IR, ^1H , ^{13}C NMR, APCIMS and ESIMS data were the same as **169a**.

Antibacterial activity

Antibacterial activity against *S. aureus* was evaluated using the microdilution method (Banfi et al. 2003) with modifications as reported previously (Lavoie et al. 2013). The lowest concentration at which no growth was observed was defined as the minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC was evaluated after 6 and 24 hours. Gentamycin and Chloramphenicol were used as positive controls.

Cytotoxicity

Cytotoxicity was evaluated against human fibroblast cell line WS1 using the resazurin reduction test reported previously (O'Brien et al. 2000; Bellila et al. 2011). Cytotoxicity was expressed as the concentration inhibiting 50 % of cell growth (IC_{50}). Etoposide was used as a positive control.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by NSERC (doctoral scholarship to FS) and Fonds de recherche nature et technologies (doctoral scholarship to FS). The authors would like to thank F. Otis and N. Voyer from PROTEO and Université Laval for their help in recording circular dichroism spectra and C. Dusseault for its technical assistance in the evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article (^1H and ^{13}C NMR) of racemic **162-169** are available free of charge via the Internet. (Annexe 2)

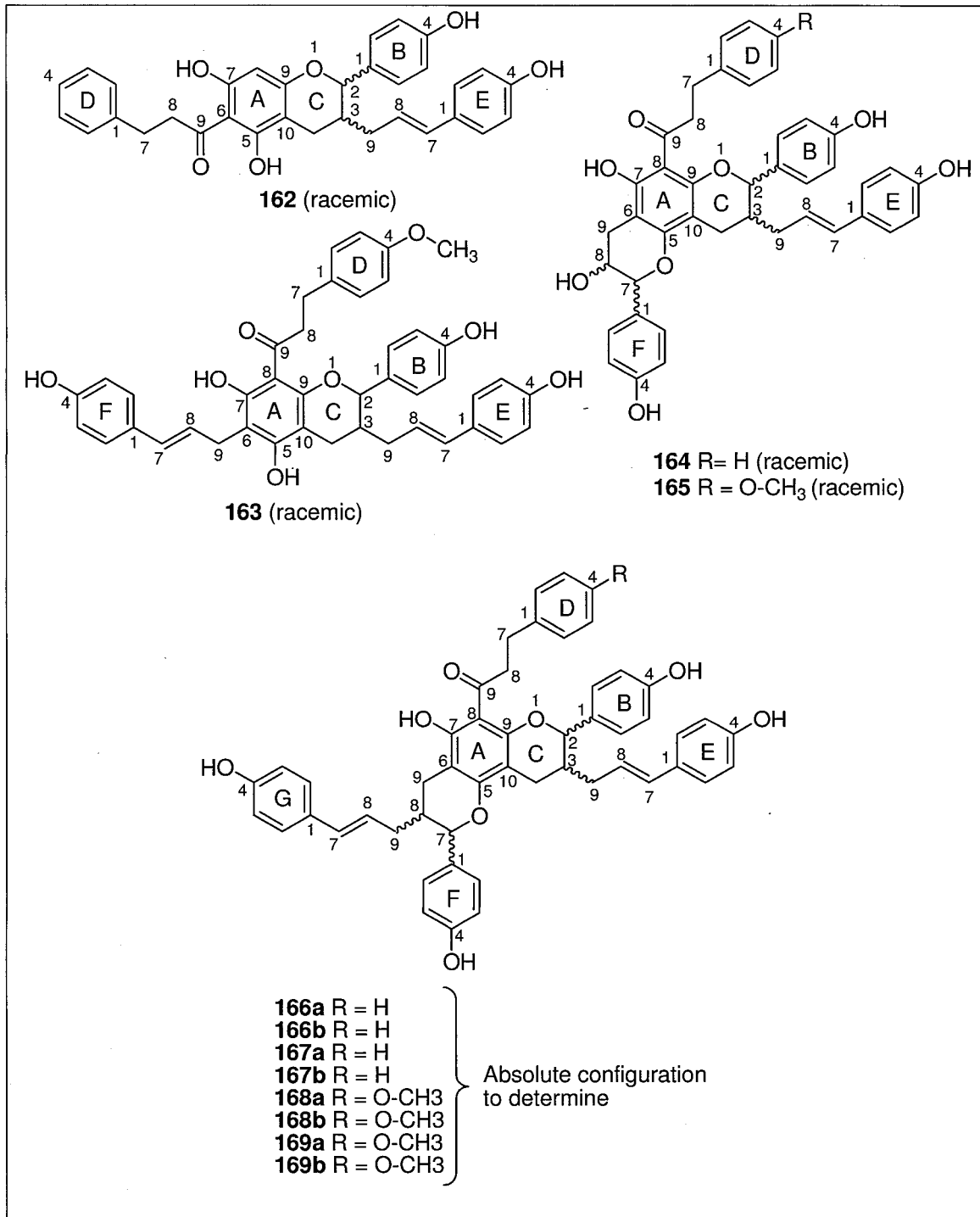
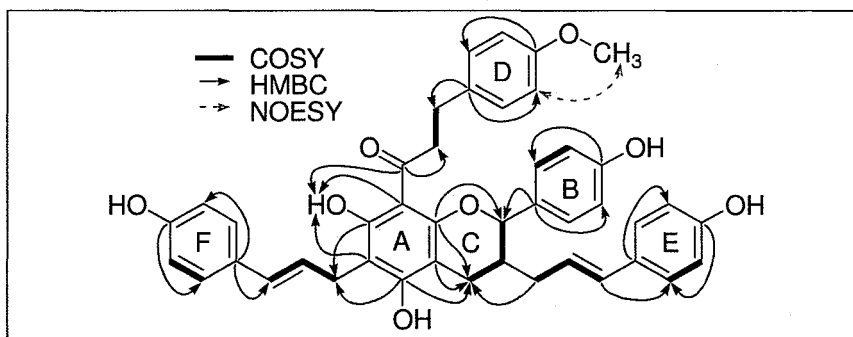
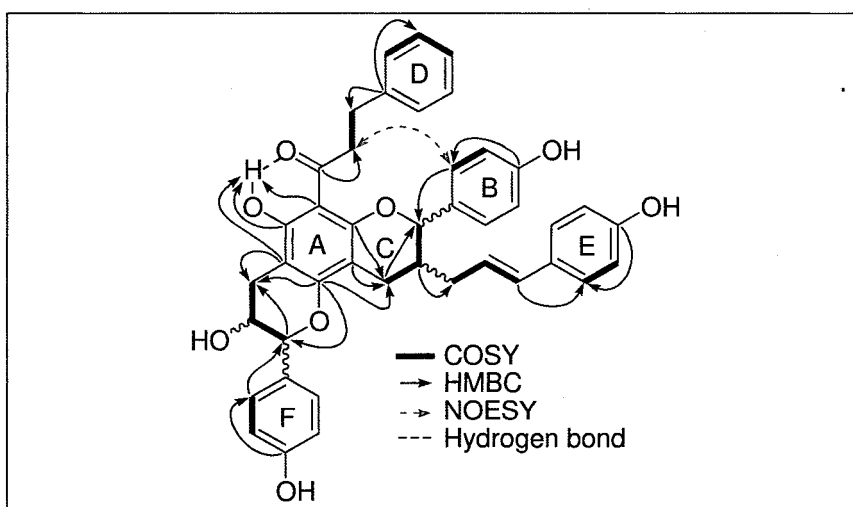


Figure 32: Structure of compounds 162-169

Figure 33: HMBC, COSY, NOESY key data for identification of compound **163**.Figure 34: HMBC, COSY, NOESY key data for identification of compound **164**.

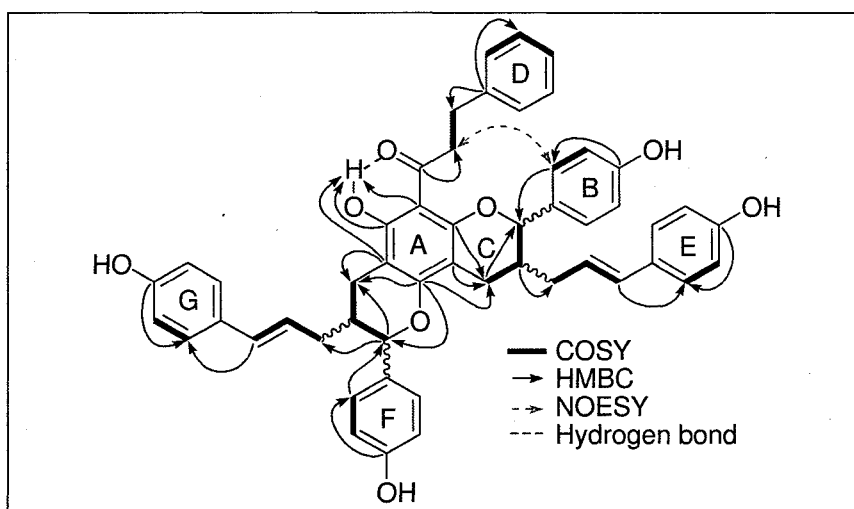


Figure 35: HMBC, COSY, NOESY key data for identification of compound **166**.

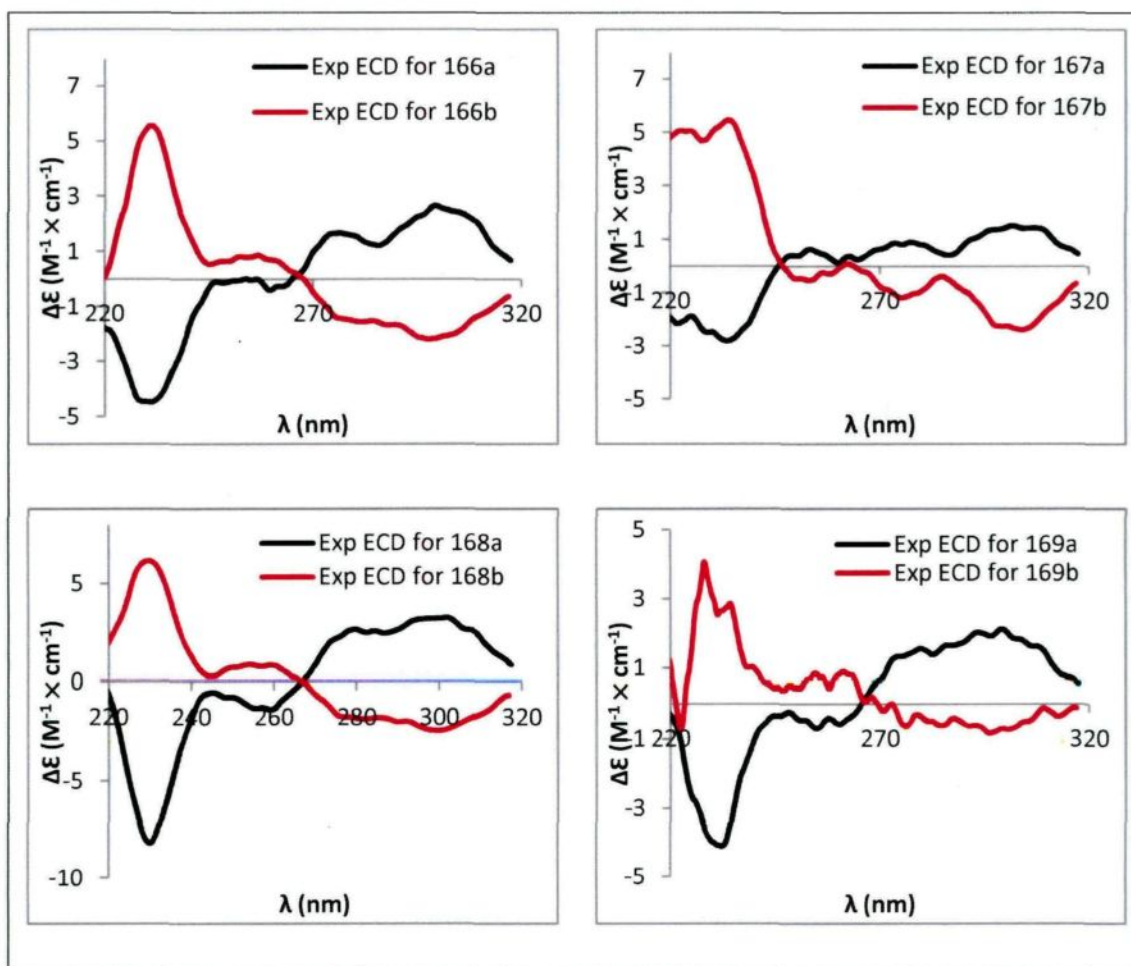


Figure 36: Experimental ECD spectra for compounds **166a**, **166b**, **167a**, **167b**, **168a**, **168b**, **169a** and **169b**.

Table 19: ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data of compounds **162-165** (100 MHz)

Unit	No.	162^a		163^a		164^b		165^a	
		δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)
A	5	164.9	-	161.3	-	157.9	-	159.4	-
	6	105.2	-	106.9	-	100.1	-	101.5	-
	7	160.3	-	163.5	-	161.4	-	163.4	-
	8	95.2	5.94, s	105.3	-	104.0	-	105.5	-
	9	162.3	-	157.4	-	155.5	-	156.9	-
	10	102.5	-	101.9	-	100.6	-	101.2	-
	5-OH	-	14.10, s	-	-	-	-	-	-
	7-OH	-	-	-	14.32, s	-	14.09, s	-	14.25, s
B	1	130.1	-	131.0	-	129.1	-	131.2	-
	2	128.1	7.29, m ^c	129.8	7.37, d (8.1)	128.6	7.32, d (8.4)	129.8	7.40, d (8.3)
	3	116.1	6.90, d (8.6)	116.4	6.94, d (8.1)	115.2	6.82, d (8.4)	116.4	6.94, d (8.3)
	4	158.4	-	158.6	-	157.5	-	158.7	-
C	2	83.6	4.79, d (8.8)	83.7	4.76, d (9.6)	82.3	4.82, d (9.2)	83.8	4.86, d (9.3)
	3	38.3	2.22, m	37.9	2.27, m	35.9	2.28, m	37.9	2.32, m
	4	24.9	2.33, dd (16.3, 10.3)	26.6	2.46, dd (16.0, 11.0)	24.6	2.31, m	25.9	2.41, dd (16.2, 10.7)
			2.84, dd (16.3, 4.7)		2.96, dd (16.0, 4.7)		2.75, m ^c		2.91, m ^c
D	1	142.9	-	133.9	-	140.6	-	133.9	-
	2	129.3	7.28, m ^c	129.8	6.69, s	127.9	7.12, m ^c	129.8	6.72, s
	3	129.2	7.27, m ^c	114.3	6.69, s	127.8	6.76, d (7.5)	114.4	6.72, s
	4	126.6	7.17, m	158.6	-	125.5	7.12, m ^c	158.6	-
	7	31.4	2.99, dd (8.1, 7.5)	29.4	2.75, t (8.1)	29.8	2.76, t (8.1)	30.4	2.77, t (7.9)
			3.42, dd (8.1, 7.5)						
	8	46.4	-	46.1	3.14, m	44.2	3.12, m	46.1	3.18, m
	9	205.5	-	205.5	-	204.3	-	205.8	-
	4-O-CH ₃	-	-	55.3	3.72, s	-	-	55.4	3.74, s
E	1	130.1	-	130.1	-	128.0	-	130.2	-
	2	128.1	7.23, d (8.6)	128.1	7.20, d (8.0)	127.0	7.11, m ^c	128.1	7.16, d (8.4)
	3	116.1	6.77, d (8.6)	116.1	6.77, d (8.0)	115.2	6.67, d (8.4)	116.2	6.75, d (8.4)
	4	157.6	-	157.6	-	156.6	-	157.6	-
	7	132.6	6.29, d (16.0)	132.6	6.27, d (15.7)	131.4	6.19, d (15.7)	132.8	6.25, d (15.3)
							5.88, m		
	8	124.7	6.03, m	124.5	6.01, m	123.1	5.88, m	124.5	5.98, m
9	36.3	1.98, m	36.2	1.97, m	34.6	1.94, m	36.0	2.04, m ^c	
		2.19, m		2.15, m		2.06, m		2.19, m	
F	1	-	-	130.4	-	129.0	-	130.7	-
	2	-	-	127.9	7.16, d (8.2)	127.5	7.09, m ^c	129.0	7.21, d (8.4)
	3	-	-	116.1	6.74, d (8.2)	114.9	6.73, d (8.5)	116.0	6.82, d (8.3)
	4	-	-	157.3	-	157.0	-	158.2	-
	7	-	-	130.1	6.36, d (15.7)	81.4	4.94, d (6.3)	83.3	4.94, d (6.8)
	8	-	-	126.1	6.17, m	65.2	3.97, m	67.6	4.09, m
	9	-	-	26.3	3.52, d (5.7)	25.7	2.48, m ^c	27.3	2.60, dd (16.2, 7.6)
							2.60, dd (16.2, 4.6)		2.84, m ^c
							-		-

^aRecorded in acetone-d₆. ^bRecorded in MeOD. ^cOverlapped signals

Table 20: ^{13}C and ^1H NMR spectroscopic data of compounds **166-169** in acetone- d_6 (100 MHz)

Unit	No.	166		167		168		169		
		δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	
A	5	160.0	-	160.0	-	160.0	-	160.0	-	
	6	102.6	-	102.7	-	102.7	-	102.7	-	
	7	163.3	-	163.2	-	163.3	-	163.3	-	
	8	105.3	-	105.2	-	105.3	-	105.2	-	
	9	156.7	-	156.7	-	156.7	-	156.7	-	
	10	101.8	-	101.9	-	101.8	-	101.8	-	
	7-OH	-	14.24, s	-	14.25, s	-	14.30, s	-	14.30, s	
B	1	131.2	-	131.1	-	131.2	-	131.2	-	
	2	129.7	7.36, d (8.4)	129.8	7.37, d (8.2)	129.8	7.37, d (8.3)	129.8	7.37, d (8.3)	
	3	116.3	6.90, d (8.4)	116.3	6.91, d (8.2)	116.4	6.93, d (8.3)	116.4	6.93, d (8.3)	
	4	158.6	-	158.6	-	158.6	-	158.6	-	
C	2	83.8	4.86, d (9.4)	83.7	4.82, d (9.2)	83.7	4.83, d (8.8)	83.7	4.80, d (9.0)	
	3	37.8	2.26, m ^a	37.9	2.30, m ^a	37.7	2.26, m ^a	37.8	2.30, m ^a	
	4	25.7	2.40, m ^a	25.8	2.38, m ^a	25.7	2.39, m ^a	25.9	2.35, m ^a	
			2.80, m ^a	2.85, m ^a	2.80, m ^a	2.83, m ^a				
D	1	142.2	-	142.1	-	133.9	-	133.9	-	
	2	129.0	6.84, d (7.5)	128.9	6.82, d (7.4)	129.8	6.71, s	129.8	6.70, s	
	3	129.0	7.14, m ^a	129.0	7.15, m ^a	114.4	6.71, s	114.3	6.70, s	
	4	126.4	7.08, t (7.3)	126.4	7.08, t (7.1)	158.7	-	158.7	-	
	7	31.2	2.83, m ^a	31.2	2.82, m ^a	30.4	2.76, m ^a	30.3	2.75, t (8.1)	
	8	45.8	3.20, m	45.8	3.18, m	46.1	3.14, m	46.1	3.14, m	
	9	205.6	-	205.6	-	205.7	-	205.7	-	
		4-O-CH ₃	-	-	-	-	55.3	3.73, s	55.3	3.73, s
	E	1	130.1	-	130.1	-	130.1	-	130.1	-
2		128.1	7.12, m ^a	128.1	7.12, m ^a	128.1	7.13, d (8.4)	128.1	7.13, d (8.4)	
3		116.1	6.73, d (8.3)	116.2	6.75, d (7.1)	116.1	6.73, d (8.4)	116.1	6.74, d (8.4)	
4		157.6	-	157.7	-	157.6	-	157.6	-	
7		132.7	6.22, d (15.9)	132.7	6.21, d (15.9)	132.6	6.21, d (15.9)	132.7	6.21, d (15.6)	
8		124.5	5.94, m	124.5	5.94, m	124.5	5.93, m	124.5	5.94, m	
9		36.1	2.03, m ^a	35.9	2.02, m ^a	36.1	2.00, m ^a	36.0	2.01, m ^a	
			2.19, m ^a	2.19, m ^a	2.17, m ^a	2.17, m ^a				
F		1	131.6	-	131.5	-	131.5	-	131.6	-
	2	129.2	7.26, d (8.3)	129.2	7.26, d (8.1)	129.3	7.26, d (8.3)	129.3	7.26, d (8.2)	
	3	116.1	6.87, d (8.3)	116.2	6.87, d (8.1)	116.1	6.87, d (8.3)	116.1	6.87, d (8.2)	
	4	158.4	-	158.4	-	158.4	-	158.4	-	
	7	83.6	4.88, d (8.8)	83.7	4.87, d (8.2)	83.6	4.86, d (7.6)	83.7	4.86, d (8.3)	
	8	38.2	2.22, m ^a	38.3	2.18, m ^a	38.2	2.20, m ^a	38.3	2.19, m ^a	
	9	24.5	2.39, m	24.7	2.38, m	24.6	2.36, m ^a	24.7	2.35, m ^a	
			2.82, m ^a	2.85, m ^a	2.83, m ^a	2.83, m ^a				
	G	1	130.1	-	130.1	-	130.0	-	130.1	-
2		128.1	7.22, d (8.4)	128.1	7.22, d (8.4)	128.1	7.22, d (8.5)	128.1	7.22, d (8.2)	
3		116.1	6.77, d (8.4)	116.2	6.78, d (8.4)	116.1	6.77, d (8.5)	116.1	6.77, d (8.2)	
4		157.6	-	157.7	-	157.7	-	157.6	-	
7		132.6	6.30, d (15.8)	132.6	6.30, d (15.7)	132.6	6.29, d (15.8)	132.6	6.29, d (15.7)	
8		124.8	6.03, m	124.7	6.03, m	124.7	6.03, m	124.8	6.02, m	
9		36.4	2.03, m ^a	36.3	2.02, m ^a	36.4	2.00, m ^a	36.4	2.01, m ^a	
			2.19, m ^a	2.19, m ^a	2.17, m ^a	2.17, m ^a				

^aOverlapped signals

Table 21: Antibacterial activity and cytotoxicity of compounds **162-169**

Compounds	Antibacterial activity MIC (μM) ^a	Cytotoxicity IC ₅₀ (μM) ^b
(±)- 162	> 50	> 50
(±)- 163	6.25	> 50
(±)- 164	6.25	> 25
(±)- 165	50	> 50
(±)- 166	> 50	5 ± 1
(±)- 167	> 50	> 50
(±)- 168	> 50	> 50
(±)- 169	> 50	> 50
Chloramphenicol	0.94	ND
Gentamycin	0.020	ND
Etoposide	ND	23 ± 3

^aMinimal Inhibitory Concentration of *S. aureus* growth after 24 hours.

^bConcentration inhibiting the growth of fifty percent of human skin fibroblasts WS1 growth after 48 hours. Mean ± SD (n=3).
ND, not determined

CHAPITRE 9

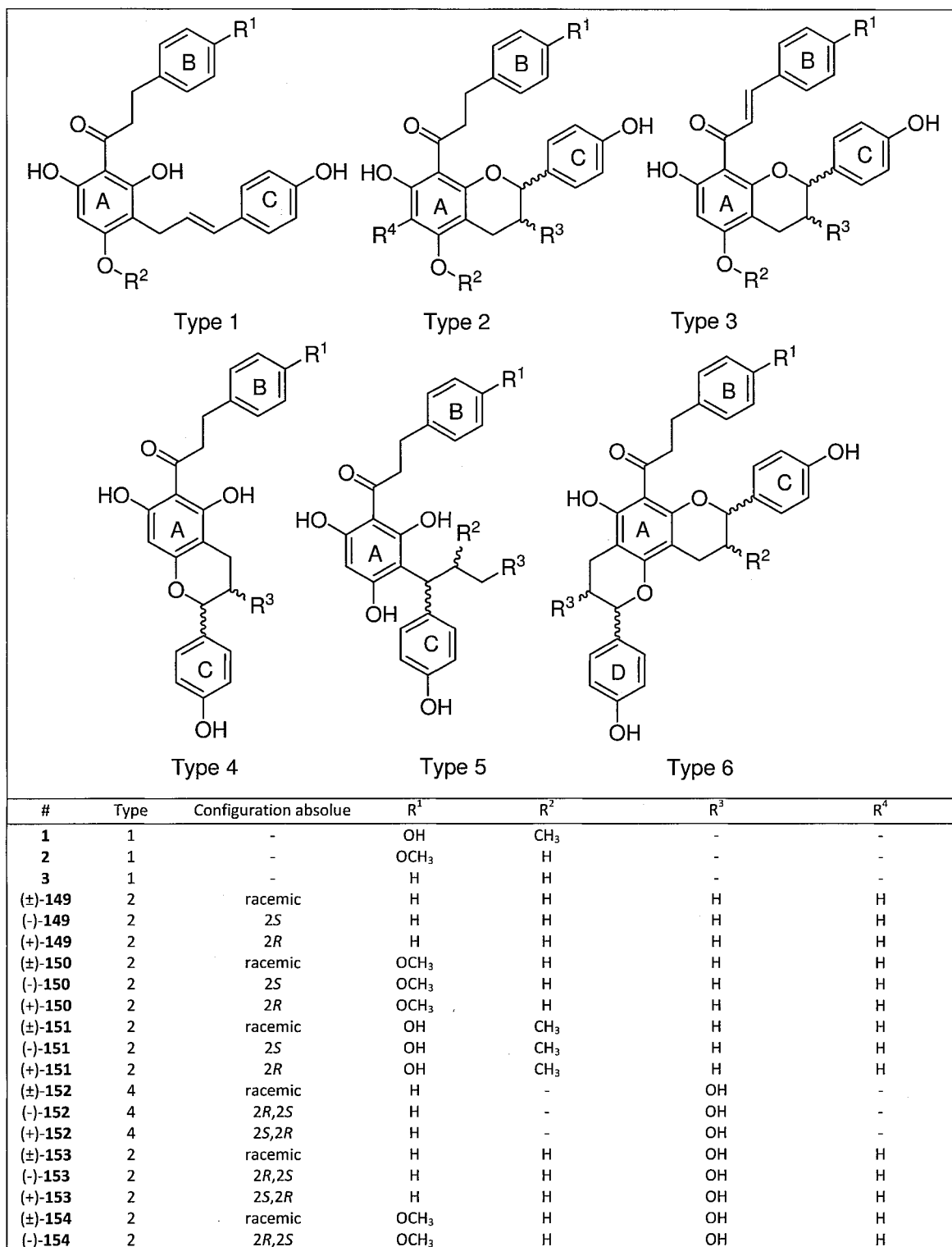
ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES BALSACONES ISOLÉES SUR DES SOUCHES DE SARM

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans le but d'en connaître davantage sur la largeur du spectre d'activité des balsacones isolées dans le cadre des travaux de cette thèse, leur capacité à inhiber la croissance des SARM a été évaluée *in vitro*. Les concentrations minimales inhibitrices obtenues après 24 h d'incubation pour dix différentes souches de SARM isolées dans les laboratoires de l'hôpital de Chicoutimi et pour une souche de *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) sont compilées dans le tableau 22. Ce tableau présente aussi la cytotoxicité des composés isolés (IC_{50}) contre une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1) puisque l'innocuité est une caractéristique importante lors de la mise au point d'antibiotiques. Pour plusieurs des composés isolés, les résultats compilés comprennent à la fois ceux des mélanges racémiques et des énantiomères purifiés. La figure 37 présente ensuite les structures de toutes les balsacones isolées dans le cadre de ces travaux. Dans le but de simplifier la présentation et de mieux faire ressortir les similarités structurales des balsacones, leurs structures ont été représentées par six différents types de squelettes sur lesquels se retrouvent différents substituants.

Tableau 22: Activité antibactérienne des composés isolés contre une souche de *S. aureus* sensible et dix souches de SARM ainsi que la cytotoxicité sur une souche de fibroblastes de peau humaine (WS1)

Composés	Activité antibactérienne (CMI, μ M)											Cytotoxicité (IC_{50} , μ M)	
	S. aureus	SARM											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		WS1
1	> 50	> 50	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	> 50	50.0	29 \pm 16
2	> 50	50.0	25.0	12.5	12.5	12.5	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	> 50
3	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	50.0	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25	25 \pm 2
(\pm)-149	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	25.0	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	16 \pm 2
(-)-149	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	> 50
(+)-149	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25	25.0	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	> 50
(\pm)-150	6.25	12.5	6.25	3.13	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	3.13	3.13	27 \pm 2
(-)-150	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
(+)-150	25.0	12.5	12.5	12.5	25.0	12.5	25.0	12.5	12.5	12.5	25.0	25.0	> 50
(\pm)-151	> 50	> 50	50.0	> 50	> 50	> 50	50.0	50.0	> 50	50.0	50.0	50.0	16 \pm 4
(-)-151	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
(+)-151	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
(\pm)-152	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	50.0	> 50	25.0	> 50	> 50	> 50	> 50	10.1 \pm 0.8
(-)-152	25.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	25.0	> 50	> 50	50.0	50.0	> 50
(+)-152	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	> 50	> 50	> 50	> 50
(\pm)-153	25.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	> 50
(-)-153	25.0	50.0	25.0	50.0	50.0	25.0	50.0	25.0	50.0	50.0	25.0	25.0	> 50
(+)-153	25.0	25.0	25.0	25.0	50.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	> 50
(\pm)-154	25.0	> 50	25.0	50.0	25.0	25.0	25.0	12.5	50.0	25.0	50.0	50.0	8.2 \pm 1.0
(-)-154	25.0	50.0	25.0	25.0	12.5	12.5	50.0	25.0	> 50	50.0	25.0	25.0	> 50
(+)-154	25.0	> 50	50.0	> 50	50.0	> 50	50.0	25.0	50.0	50.0	> 50	> 50	> 50
(\pm)-155	50.0	25.0	25.0	12.5	25.0	3.13	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	30 \pm 1
(-)-155	> 50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33 \pm 3
(+)-155	25.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32 \pm 4
(\pm)-156	25	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	33 \pm 4
(-)-156	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25 \pm 1
(+)-156	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26.3 \pm 0.3
(\pm)-157	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	32 \pm 3
(+)-157	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	3.13	6.25	3.13	12.5	3.13	3.13	3.13	33 \pm 7
(-)-157	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	3.13	6.25	12.5	12.5	15 \pm 2
(\pm)-158	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25	40 \pm 2
(+)-158	25.0	25.0	25.0	6.25	25.0	25.0	25.0	12.5	25.0	25.0	25.0	25.0	35 \pm 3
(-)-158	25.0	25.0	25.0	12.5	25.0	12.5	25.0	25.0	25.0	12.5	25.0	25.0	28 \pm 2
(\pm)-159	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	45 \pm 3
(+)-159	12.5	25.0	12.5	12.5	25.0	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	19 \pm 2
(-)-159	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	16 \pm 3
(\pm)-160	3.13	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	36 \pm 3
(+)-160	6.25	1.56	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13	1.56	1.56	17 \pm 3
(-)-160	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	0.78	1.56	1.56	3.13	3.13	8 \pm 1
(\pm)-161	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13	0.78	1.56	1.56	3.13	1.56	1.56	1.56	39 \pm 2
(\pm)-162	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	41 \pm 2
(\pm)-163	12.5	6.25	6.25	3.13	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	25 \pm n.d.
(\pm)-164	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	> 25
(\pm)-165	50.0	25.0	25.0	25.0	50.0	12.5	50.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	> 50
(\pm)-166	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	2.3 \pm 0.5
(\pm)-167	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
(\pm)-168	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	41 \pm 4
(\pm)-169	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	20 \pm 5



#	Type	Configuration absolue	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
(+)-154	2	2 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	OCH ₃	H	OH	H
(±)-155	5	racemic	H	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(-)-155	5	n.d.	H	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(+)-155	5	n.d.	H	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(±)-156	5	racemic	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(-)-156	5	n.d.	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(+)-156	5	n.d.	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	cinnamoyle	-
(±)-157	2	racemic	H	H	4-hydroxycinnamyle	H
(+)-157	2	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	H	H	4-hydroxycinnamyle	H
(-)-157	2	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	H	H	4-hydroxycinnamyle	H
(±)-158	2	racemic	OCH ₃	H	4-hydroxycinnamyle	H
(+)-158	2	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	OCH ₃	H	4-hydroxycinnamyle	H
(-)-158	2	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	OCH ₃	H	4-hydroxycinnamyle	H
(±)-159	2	racemic	OH	CH ₃	4-hydroxycinnamyle	H
(+)-159	2	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	OH	CH ₃	4-hydroxycinnamyle	H
(-)-159	2	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	OH	CH ₃	4-hydroxycinnamyle	H
(±)-160	3	racemic	H	H	4-hydroxycinnamyle	-
(+)-160	3	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	H	H	4-hydroxycinnamyle	-
(-)-160	3	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	H	H	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-161	3	racemic	OH	CH ₃	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-162	4	racemic	H	-	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-163	2	racemic	OCH ₃	H	4-hydroxycinnamyle	4-hydroxycinnamyle
(±)-164	6	racemic	H	4-hydroxycinnamyle	OH	-
(±)-165	6	racemic	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	OH	-
(±)-166	6	racemic	H	4-hydroxycinnamyle	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-167	6	racemic	H	4-hydroxycinnamyle	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-168	6	racemic	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	4-hydroxycinnamyle	-
(±)-169	6	racemic	OCH ₃	4-hydroxycinnamyle	4-hydroxycinnamyle	-

Figure 37: Structures des balsacons isolées qui ont été testées *in vitro* contre les souches de SARM.

Les résultats compilés dans le tableau 22 démontrent que plusieurs des balsacons isolées ont non seulement inhibé la croissance de la souche de SASM, mais aussi celle des souches de SARM. En effet, les CMI obtenues sont du même ordre de grandeur pour la souche de SASM que pour les dix souches de SARM. Les souches de SARM obtenues de l'hôpital de Chicoutimi ne montrent donc pas de résistance remarquable envers les balsacons qui possèdent une activité antibactérienne *in vitro* contre la souche de SASM. Seulement dix des quarante-six composés testés n'ont pas montré d'activité inhibitrice à la concentration maximale testée de 50,0 µM. Des valeurs de CMI en dessous de 10 µg/ml pour des composés isolés à partir de plantes sont considérées par certains auteurs comme très intéressantes (Ríos et Recio 2005). Parmi les balsacons isolées, les composés **3**, (±)-150, (±)-157, (-)-157, (+)-157, (±)-159, (±)-160, (-)-160, (+)-160, (+)-161, (+)-163 et (+)-164 répondent à ce critère contre au moins une des souches testées ayant montré des CMI variant entre 0,78 uM et 6,25 µM. Les composés (-)-149 et (+)-149, pour lesquelles de valeurs de CMI de

6,25 μM ont été obtenues contre plusieurs des souches testées, n'ont pas démontré de cytotoxicité contre WS1 ($> 50 \mu\text{M}$) et sont donc aussi dignes de mention.

Bien qu'aucune relation structure-activité précise n'ait pu être formulée, quelques éléments structuraux semblant influencer l'activité antibactérienne des balsacones ont été observés:

- De façon générale, l'inversion de la stéréochimie des composés ne semble pas affecter l'activité antibactérienne puisqu'il n'y a pas de différence marquée entre l'activité antibactérienne des deux énantiomères d'un même composé. De plus, l'activité antibactérienne des énantiomères est, dans la plupart des cas, similaire à celle des mélanges racémiques dont ils proviennent. Le composé racémique **159** fait figure d'exception puisque les composés (-)-**159** et (+)-**159** ont montré une activité plus prononcée que le mélange racémique d'origine.
- La présence d'un hydroxyle en position R^3 des structures de type 2 semble nuire à l'activité antibactérienne puisque les composés (\pm)-**153**, (-)-**153** et (+)-**153** ont montré des activités moins marquées sur la plupart des souches que leurs homologues sans hydroxyle en R^3 , (\pm)-**149**, (-)-**149** et (+)-**149**.
- La présence d'un groupement hydroxycinnamyle en R^3 des structures de type 2 ne semble pas affecter l'activité puisque les composés (\pm)-**157**, (-)-**157** et (+)-**157** ont montré des CMI similaires à celles de leurs homologues sans le groupement (\pm)-**149**, (-)-**149** et (+)-**149**.
- La présence de la liaison double supplémentaire dans les structures de type 3 ((\pm)-**160**, (-)-**160**, (+)-**160** et (\pm)-**161**) ne semble pas avoir d'impact sur l'activité antibactérienne puisque ces composés ont des CMI similaires à leurs homologues de type 2 qui ne possèdent pas cette liaison double ((\pm)-**157**, (-)-**157**, (+)-**157**, (\pm)-**159**, (-)-**159** et (+)-**159**.
- La présence d'un groupement OCH_3 en position R^1 sur la structure de type 6 semble nuire à l'activité antibactérienne puisque le composé (\pm)-**164** est plus actif que le composé (\pm)-**165**.

- Tous les composés possédant une structure de type 6 et deux groupements 4-hydroxycinnamyles en positions R² et R³ n'ont pas montré d'activité (> 50 µM) alors que les composés (±)-**164** et (±)-**165** qui ne possèdent qu'un seul groupement 4-hydroxycinnamyle en position R² et un hydroxyle en position R³ ont permis d'obtenir des CMI variant entre 6,25 et 50,0 µM. La substitution de l'hydroxyle par une unité 4-hydroxycinnamyle semble donc nuire à l'activité antibactérienne.
- Le composé (±)-**162**, possédant une structure de type 4, diffère des composés (±)-**157**, (-)-**157** et (+)-**157** de type 2 par le fait que l'hétérocycle pyrannique implique l'oxygène en *para* du carbonyle de la dihydrochalcone plutôt que celui en *ortho* (figure 37). Les composés (±)-**157**, (-)-**157** et (+)-**157** sont plus actifs que le composé (±)-**162** ce qui suggère que l'hydroxyle libre en *para* pourrait être favorable à l'activité antibactérienne. La même tendance a été observée dans le cas du composé **1** dont l'hydroxyle en *para* du carbonyle de la dihydrochalcone est méthoxylé. Ce dernier est moins actif que le composé **3**, son homologue avec la fonction hydroxyle libre.

Ces observations pourront être utilisées pour orienter la poursuite du développement du « scaffold » basé sur les dihydrochalcones hydroxycinnamylés. Les résultats convaincants sur les souches de SARM permettent de mieux évaluer le potentiel de développement de ce « scaffold ». Des travaux statistiques plus approfondis pourraient être entrepris afin de potentiellement permettre de confirmer les tendances qui ont pu être observées jusqu'à maintenant.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolation et identification des souches de SASM et de SARM

Entre mars 2007 et mars 2008, trente-cinq écouvillons de narines, gorges et de pus à l'aîne ont été récoltés chez des patients hospitalisés à l'hôpital de Chicoutimi. L'identification de *S. aureus* dans ces échantillons a été effectuée en utilisant le Slidex Staph-Kit (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo.) selon les instructions du manufacturier. Le contrôle de la qualité a été effectué avec la souche de SARM ATCC 43300 et la souche de *S. aureus* ATCC 25923. L'identification a été confirmée à l'aide de profils obtenus sur des

bandelette de test API Staph trempées dans des suspensions bactériennes préparées avec un standard McFarland 0,5 (bioMérieux, Durham, NC) selon le protocole du manufacturier. Un test d'agglutination du latex (SLIDEX) permettant de détecter la résistance à la méticilline chez les Staphylococci a aussi été effectué. Ce test est basé sur la production de PBP2a de faible affinité qui est encodée par le gène *mecA*. Un antibiogramme (test de diffusion sur disque) a enfin été effectué pour confirmer l'identification des souches de SARM.

Test de susceptibilité des souches de SARM par la méthode de diffusion sur disque

L'activité antimicrobienne de différentes classes d'antibiotiques a été déterminée sur les souches utilisées par la méthode de diffusion sur disque (*Kirby-Bauer*) comme elle a été décrite par la Clinical and Laboratory Standards Institute. Les antibiotiques testés incluaient: la pénicilline, l'amoxicilline/clavulanic acid, la ciprofloxacine, la moxifloxacine, la levofloxacine, la clindamycine, l'érythromycine, la cefoxitine, le linézolide, la triméthoprime/sulfaméthoxazole, la rifampicine, la gentamicine et la vancomycine. Le pH du milieu Agar était entre 7,2 et 7,4 avant l'inoculation des souches. Les cultures pures ont été inoculées sur une plaque non sélective pour 18 à 24 h puis transférées dans un tube contenant 4 à 5 ml de bouillon tryptic-soy. La densité de l'inoculum a été standardisée en utilisant le standard McFarland 0,5. Des plaques d'Agar Muller-Hinton ont ensuite été inoculées et les disques appropriés ont été appliqués à leurs surfaces. Ces plaques ont ensuite été incubées pour des périodes de 16 à 24 h. Les zones d'inhibition ont été mesurées avec une règle millimétrique et l'interprétation de la taille des zones a été effectuée grâce aux références du fabricant. L'organisme qui a été utilisé comme contrôle était la souche ATCC 25923.

Évaluation de l'activité antibactérienne des balsacones sur les souches de SASM et de SARM

L'activité antibactérienne des balsacones isolés dans le cadre de cette thèse a été évaluée par la méthode de microdilution décrite par Banfi et *al.* (Banfi et al. 2003) avec quelques modifications. Sommairement, les bactéries en croissance exponentielle des souches de SASM et de SARM ont été déposées dans des microplaques 96 puits à une densité de 40×10^3 bactéries par puits dans 100 μ l de

bouillon nutritif (Difco). Des concentrations croissantes des composés testés dans le DMSO (Sigma-Aldrich) ont ensuite été ajoutées (100 μ l par puits). La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture a été maintenue à 0,1 % (v/v) pour éviter la toxicité du solvant. Les microplaques ont été incubées pour 24 h à 37 °C. L'absorbance a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque Varioskan (Thermo, Labsystems) à une longueur d'onde de 660 nm. Les CMI ont été déterminées comme étant la concentration la plus basse à laquelle aucune croissance n'a été observée.

CHAPITRE 10

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Avant de revenir sur l'objectif principal du projet de recherche présenté dans cette thèse, les accomplissements en lien avec les objectifs secondaires qui avaient été fixés seront récapitulés. Le premier objectif secondaire fixé était de développer une méthode de fractionnement de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* guidée par l'activité antibactérienne. Deux méthodes de fractionnement alternatives ont été mises aux points dans le cadre de cette thèse. La méthode 1 (annexe 3) a mené aux fractions enrichies permettant ensuite de procéder à l'isolement des composés présentés dans les chapitres 5, 6 et 7 ainsi que deux des composés présentés au chapitre 8. Cette méthode a aussi conduit à l'isolement d'une plus grande quantité des balsacones A (1), B (2) et C (3) (deuxième objectif secondaire) permettant ainsi de procéder à la publication de leur caractérisation complète et de leur activité antibactérienne *in vitro* (chapitre 4). Sommairement, la méthode de fractionnement consiste en deux étapes d'extractions liquide-liquide suivies de deux étapes de chromatographie sur colonne de gel de silice et d'une étape de chromatographie « flash » en phase inverse (C18). Cette méthode a été développée dans une optique exploratoire et l'activité antibactérienne face à *S. aureus* était le critère de sélection des fractions à refractionner d'avantage ou à purifier. Ainsi, à l'annexe 3, la fraction MeOH, la fraction Et₂O, la fraction F et la fraction F4 ont tous montré une activité antibactérienne contre *S. aureus* similaire à l'extrait brut (CMI variant entre 12.5 et 50 µg/ml)

tout en possédant des profils chimiques moins complexes. La seconde méthode de fractionnement a été développée plus tard au cours du projet et est plutôt optimisée vers l'isolement des dihydrochalcones hydroxycinnamylées (balsacones) avec de meilleurs rendements. Cette seconde méthode a d'ailleurs été développée sur une plus grande quantité d'extrait brut de bourgeons (1 kg) permettant l'isolement et l'identification de balsacones qui étaient présentes en plus faible quantité. Les fractions D1c, D4g, D5g et D7l (annexe 4) ont d'ailleurs permis l'isolement des balsacones P, Q, T, U, V et W, présenté au chapitre 8. Cette méthode devrait être privilégiée si l'isolement de certaines balsacones est nécessaire lors de travaux futurs.

Le troisième objectif secondaire était d'isoler les composés présents dans les fractions actives obtenues par la méthode de fractionnement mise au point. Les travaux réalisés dans le but d'atteindre cet objectif représentent une partie importante des travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat. L'isolement des 23 balsacones (A-W) a nécessité la mise au point de méthodes de purification uniques pour la plupart d'entre elles. L'extrait brut de bourgeons de *P. balsamifera* s'est avéré être une matrice complexe ce qui a complexifié la purification des composés présents dans les fractions actives. En effet, plusieurs étapes ont généralement été nécessaires à la purification des balsacones, et ce malgré les étapes de fractionnement effectuées préalablement. À titre d'exemple, l'isolement de la balsacone D (**149**) a nécessité une étape d'extraction solide-liquide, une étape de purification sur colonne de gel de silice et une purification finale par HPLC préparative (chapitre 5). De plus, les similarités structurales entre les différentes balsacones ont rendu nécessaire l'utilisation de la HPLC préparative pour la purification finale de presque toutes les balsacones. L'efficacité du support utilisé en HPLC a dû être poussée à sa limite dans certains cas avec des méthodes s'étendant sur près de 90 minutes. Bien que certaines des méthodes de purification développées au cours de ce projet pourraient être optimisées davantage, elles représentent un outil très complet qui sera fort utile pour la poursuite du développement des balsacones en tant qu'antibactériens. Ces connaissances pourraient aussi être utiles pour l'étude d'autres matrices contenant des composés de nature similaire tels

que la propolis et des extraits de bourgeons d'autres espèces de *Populus*. Elles contribuent aussi, de façon plus générale, à approfondir les connaissances concernant l'isolement des produits naturels phénoliques.

Le quatrième objectif secondaire de ce projet était de procéder à la caractérisation complète des composés obtenus suite à la purification des fractions actives. Avec la purification, les travaux de caractérisation effectués sur les composés isolés représentent le cœur de cette thèse. La structure planaire des vingt-trois composés isolés a pu être déterminée surtout grâce à l'utilisation de la spectroscopie RMN en mettant à profit les techniques COSY, HSQC, HMBC et NOESY. L'élucidation des structures à partir des données RMN a constitué un certain défi analytique, particulièrement dans le cas des balsacones Q-W (**163-169**). Ces dernières possèdent des structures imposantes qui contiennent des sections très similaires causant ainsi la superposition de plusieurs signaux sur les spectres. Il n'existe que quelques mentions de produits naturels hydroxycinnamylés dans la littérature scientifique. L'isolement de vingt-trois dihydrochalcones substitué par une à quatre unités hydroxycinnamyles constitue donc, selon l'auteur de cette thèse, une découverte importante dans le domaine des produits naturels. Cette découverte a d'ailleurs déjà mené à une publication dans le journal *Tetrahedron Letters* (chapitre 4) et devrait permettre de soumettre dans un avenir rapproché 4 autres articles (chapitre 5-8) dans des journaux renommés dans ce domaine tel que *Phytochemistry*, *Journal of Natural Products* et *Organic Letters*.

La détermination de la configuration absolue des composés isolés a constitué un défi plus important que prévu lors de l'élaboration de ce projet de thèse. En effet, les balsacones D-W (**149-169**) ont toutes été isolées sous la forme de mélanges racémiques. Des analyses de dichroïsme circulaire, de rotation spécifique et par HPLC en utilisant un support chiral ont permis de conclure de la nature racémique de ces composés. Pourtant, l'isolement de produits naturels racémiques est un fait plutôt rare (Finefield et al. 2012). La purification sur un support chiral de 16 des mélanges racémiques obtenus a été effectuée, générant ainsi 32 énantiomères purifiés. La configuration absolue de vingt de ceux-ci (chapitre 5 et 7) a jusqu'à maintenant pu être déterminée grâce à des analyses de diffraction de rayon X et à des comparaisons

entre les spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux et ceux calculés à partir de fondements théoriques. Cette méthode sera aussi appliquée à la détermination de la configuration absolue des autres énantiomères purifiés dans le cadre de ces travaux. La génération des spectres de dichroïsme circulaire calculés pour les composés présentés au chapitre 6 et 8 représente un défi plus important à cause de la complexité de leurs structures. Ces calculs sont en cours au LASEVE, mais n'ont pas pu être complétés à temps pour le dépôt de cette thèse. Puisque la séparation chirale continue d'être un défi technique important en chimie analytique (Xiao et al. 2012), les 32 énantiomères obtenus dans ces travaux représentent une banque unique de produits naturels qui pourrait avoir des applications variées. En spectroscopie, elle pourrait permettre d'établir des corrélations entre la configuration absolue et les données expérimentales de dichroïsme circulaire électronique ou vibrationnel (ECD ou VCD). Il pourrait aussi être très intéressant d'étudier plus en profondeur l'effet du changement de la stéréochimie sur différentes interactions potentielles des énantiomères avec des systèmes biologiques ou des biomolécules d'intérêt. Il est d'avis de l'auteur de cette thèse que la séparation des énantiomères des mélanges racémiques combinée à la détermination de leur configuration absolue constitue un accomplissement important dans le domaine des produits naturels.

Le cinquième et dernier objectif secondaire était de déterminer l'activité antibactérienne des composés isolés *in vitro* sur plusieurs souches de bactéries incluant *S. aureus*, et des souches de SARM. La CMI des composés isolés dans le cadre de cette thèse a été déterminée pour *S. aureus* ainsi que pour 10 différentes souches de SARM (chapitre 9). Plus des trois quarts des composés de la banque ont montré une activité antibactérienne contre au moins une de ces souches à l'intérieur des concentrations testées (50 μ M). Parmi ceux-ci, quatorze se sont particulièrement démarqués avec des activités variant entre 0.78 et 6.25 μ M contre au moins une des souches. L'isolement et la caractérisation des composés présents dans les fractions actives de l'extrait de *P. balsamifera* se sont avérés être des tâches imposantes si bien que les travaux dédiés à déterminer le spectre de l'activité antibactérienne des composés isolés ont été limités dans

le cadre de cette thèse. Maintenant que la caractérisation des composés isolés est presque complétée, il sera essentiel d'évaluer l'activité antibactérienne de ces composés sur d'autres espèces et souches bactériennes. L'efficacité de certains des composés à inhiber les souches de SARM permet tout de même de conclure du potentiel des balsacones. Ces dernières pourraient constituer un excellent point de départ pour la mise au point d'un « scaffold » antibactérien et ainsi contribuer à la recherche de nouvelles familles d'antibiotiques.

L'objectif principal fixé pour ce projet de thèse était d'isoler et d'identifier les composés impliqués dans l'activité antibactérienne de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera*. Les travaux effectués ont mené à l'identification des 23 balsacones qui sont composées d'une unité dihydrochalcone substituée par des groupements hydroxycinnamyles. Parmi ceux-ci, dix ont montré des CMI similaires ou inférieures à celle de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* ($\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$) et plus des trois quarts ont montré une CMI égale ou inférieure à $50 \mu\text{M}$, la plus grande concentration testée. Plusieurs composés vraisemblablement impliqués dans l'activité antibactérienne des bourgeons de *P. balsamifera* sont donc maintenant connus. L'activité antibactérienne des composés isolés ne permet cependant pas de justifier le niveau d'activité de l'extrait dont ils proviennent. En effet, toutes les balsacones ont été isolées avec des rendements inférieurs à 0,2 %, ce qui indique que leur activité devrait être presque 500 fois supérieure à celle de l'extrait pour qu'elles en soient responsables individuellement. Ceci s'explique probablement par le fait que l'activité biologique d'un extrait de plante est souvent le résultat d'interactions de synergie complexes entre les différents composés qui y sont contenus (Wagner et Ulrich-Merzenich 2009). L'identification de composés impliqués dans l'activité constitue tout de même une étape essentielle de la valorisation du potentiel antibactérien de l'extrait brut de *P. balsamifera* ou des fractions actives obtenues lors des étapes de fractionnement. Ces matrices composées de plusieurs principes actifs agissant probablement conjointement pourraient aussi avoir des applications dans le traitement des infections résistantes. La complexité du fonctionnement de telles matrices affecte évidemment leurs perspectives de développement.

Pour terminer, certaines perspectives quant au développement de produits à application antibactérienne à partir des résultats de ces travaux sont proposées. Les travaux faisant suite à cette thèse pourraient être réalisés dans le but d'atteindre deux objectifs conjoints. En effet, autant l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* que les balsacones isolées possèdent un potentiel de développement. L'extrait pourrait devenir un ingrédient actif des produits de santé naturel ou des produits cosmétiques par exemple. Pour en faire un produit antibactérien valorisable, il faudrait d'abord s'attarder au développement de méthodes de quantification des balsacones dans l'extrait. Une telle méthode pourrait ensuite être mise à profit pour déterminer un moment de récolte idéal des bourgeons et développer une méthode d'extraction optimale pour l'obtention d'un extrait riche en principes actifs possédant une activité antibactérienne marquée. Il pourrait aussi être pertinent de vérifier si des balsacones sont présentes dans d'autres matrices végétales potentielles comme les écorces, le bois, les nœuds et les racines de *P. balsamifera*, les bourgeons d'autres espèces de *Populus* apparentées (section *tacamahaca*) ou dans différents types de propolis.

Dans le cas de la poursuite du développement des balsacones, il pourrait être intéressant d'établir un « scaffold » optimal pour effectuer les étapes subséquentes du développement. Il faudrait d'abord déterminer plus précisément le spectre d'activité des différentes balsacones en évaluant leur efficacité contre des souches de plusieurs espèces de bactéries pathogènes. La mise au point du « scaffold » pourrait passer par des études de relations structure-activité. Ce genre d'étude nécessiterait la synthèse de plusieurs dérivés des balsacones les plus actives. La synthèse de dérivés est dépendante de la disponibilité des balsacones en quantité suffisante. Deux stratégies pourraient être envisagées pour obtenir des quantités appréciables des balsacones. La synthèse totale pourrait permettre d'obtenir les balsacones possédant les structures les plus simples. L'hémisynthèse à partir de dihydrochalcones présentes en quantité appréciable dans l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* pourrait aussi être considérée. Les études de relations structure-activité devraient permettre d'établir un « scaffold » dont l'activité antibactérienne serait optimisée et peut-être même d'identifier certains groupements impliqués dans cette activité. Suite à la mise

au point du « scaffold », la poursuite de son développement en tant que produit antibactérien passerait probablement par des études d'efficacité et de toxicité *in vivo*, de mécanisme d'action et de métabolisation. Une autre avenue intéressante dans le développement de produits à application antibactérienne pourrait être d'évaluer le potentiel de synergie entre les balsacones ou de potentialisation d'antibiotiques déjà utilisés en clinique. Plusieurs produits naturels issus des plantes ont montré un potentiel de modification des mécanismes de résistance aux antibiotiques ayant pour effet de resensibiliser les bactéries à l'antibiotique (Abreu et al. 2012). Puisque l'activité antibactérienne de l'extrait de bourgeons de *P. balsamifera* est probablement le résultat d'interactions entre ses constituants, il serait intéressant de vérifier si ces interactions potentielles pourraient être mises à profit dans le développement de nouveaux produits antibactériens à partir de cette matrice végétale.

RÉFÉRENCES

- Abramovitch, R. A., Coutts, R. T. and Knaus, E. E. (1967). "Some extractives from the bark of *Populus balsamifera*." *Can. J. Pharm. Sci* **2**: 71-74.
- Abreu, A. C., McBain, A. J. and Simoes, M. (2012). "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents." *Nat. Prod. Rep.* **29**(9): 1007-1021.
- Aggarwal, B. B. and Harikumar, K. B. (2009). "Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**(1): 40-59.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A. M. (2012). "Phytoalexins in defense against pathogens." *Trends in Plant Science* **17**(2): 73-90.
- Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Araki, Y., Mishima, S. and Nozawa, Y. (2003). "Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26**(7): 1057-1059.
- Al-Hussaini, R. and Mahasneh, A. (2009). "Microbial Growth and Quorum Sensing Antagonist Activities of Herbal Plants Extracts." *Molecules* **14**(9): 3425-3435.
- Alcaraz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomaz, F. and Ferretti, F. H. (2000). "Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *Journal of Theoretical Biology* **205**(2): 231-240.
- Ali, M. S., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Saiki, I. and Kadota, S. (2001). "Antiproliferative Activity of Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **24**(5): 525-528.
- Amidon, T. E., Wood, C. D., Shupe, A. M., Wang, Y., Graves, M. and Liu, S. (2008). "Biorefinery: Conversion of Woody Biomass to Chemicals, Energy and Materials." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **2**: 100-120.
- Arct, J. and Pytkowska, K. (2008). "Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals." *Clinics in Dermatology* **26**(4): 347-357.
- Arnason, T., Hebda, R. J. and Johns, T. (1981). "Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada." *Revue canadienne de botanique* **59**: 2189-2325.
- Ávila, H. P., Smânia, E. d. F. A., Monache, F. D. and Smânia Júnior, A. (2008). "Structure-activity relationship of antibacterial chalcones." *Biorg. Med. Chem.* **16**(22): 9790-9794.
- Awouafack, M. D., Kouam, S. F., Hussain, H., Ngamga, D., Tane, P., Schulz, B., Green, I. R. and Krohn, K. (2008). "Antimicrobial Prenylated Dihydrochalcones from *Eriosema glomerata*." *Planta Med* **74**(EFirst): 50-54.
- Awouafack, M. D., Kusari, S., Lamshöft, M., Ngamga, D., Tane, P. and Spiteller, M. (2010). "Semi-Synthesis of Dihydrochalcone Derivatives and Their *in Vitro* Antimicrobial Activities." *Planta Med.* **76**(6): 640-643.
- Ayres, M. P., Clausen, T. P., MacLean, S. F., Jr., Redman, A. M. and Reichardt, P. B. (1997). "Diversity of Structure and Antiherbivore Activity in Condensed Tannins." *Ecology* **78**(6): 1696-1712.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). "Biological effects of essential oils - A review." *Food Chem. Toxicol.* **46**(2): 446-475.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chem.* **99**(1): 191-203.
- Balatinecz, J. J. and Kretschmann, D. E. (2001). Properties and utilization of poplar wood. Poplar Culture in North America. D. I. Dickmann, J. G. Isebrands, J. E. Eckenwalder and J. Richardson. Ottawa, NRC Research Press: 277-291.
- Baloglu, E. and Kingston, D. G. I. (1999). "A New Semisynthesis of Paclitaxel from Baccatin III." *J. Nat. Prod.* **62**(7): 1068-1071.

- Banfi, E., Scialino, G. and Monti-Bragadin, C. (2003). "Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility." *J. Antimicrob. Chemother.* **52**(5): 796-800.
- Bankova, V. (2005). "Recent trends and important developments in propolis research." *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2**(1): 29-32.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. and Sabatini, A. G. (2002). "Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results." *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **57**(5/6): 530-533.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2001). "Recent progress in pharmacological research of propolis." *Phytotherapy Research* **15**(7): 561-571.
- Bar-Sela, G., Epelbaum, R. and Schaffer, M. "Curcumin as an Anti-Cancer Agent: Review of the Gap Between Basic and Clinical Applications." *Current Medicinal Chemistry* **17**(3): 1-1.
- Baumann, L. S. (2007). "Less-known botanical cosmeceuticals." *Dermatologic Therapy* **20**(5): 330-342.
- Bellila, A., Tremblay, C., Pichette, A., Marzouk, B., Mshvildadze, V., Lavoie, S. and Legault, J. (2011). "Cytotoxic activity of withanolides isolated from Tunisian *Datura metel* L." *Phytochemistry* **72**(16): 2031-2036.
- Berger, R. G., Hüsni, K., Başer, C. and Demirci, F. (2007). Chemistry of Essential Oils. *Flavours and Fragrances*, Springer Berlin Heidelberg: 43-86.
- Bergeron, C., Carrier, D. J. and Ramaswamy, S. (2012). *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, Wiley.
- Black, M. J. (1980). *Algonquin Ethnobotany: An Interpretation of Aboriginal Adaptation in Southwestern Quebec*, National museum of Canada.
- Black, P. L., Arnason, J. T. and Cuerrier, A. (2008). "Medicinal plants used by the Inuit of Qikiqtaaluk (Baffin Island, Nunavut)." *Botany* **86**(2): 157-163.
- Blumenthal, M., Busse, W., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C. and Rister, R. (1998). "The Complete German Commission E Monographs. 1998." *American Botanical Council, publié en collaboration avec Integrative Medicine Communications, États-Unis.*
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J. and Unsicker, S. B. (2011). "Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses." *Phytochemistry* **72**(13): 1497-1509.
- Bonjar, S. (2004). "Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran." *J. Ethnopharmacol.* **94**(2-3): 301-305.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001). "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective." *Plant Science* **161**(5): 839-851.
- Bourgault, S., Boulfroy, A., Verstraete, A. and Plante, A. (2008). Portrait socio-économique de la région de la Capitale-Nationale. A. f. Q. métropolitain.
- Braconnot, H. (1830). "Examen chimique de l'écorce de tremble. De la présence d'une quantité remarquable de salicine dans plusieurs espèces de peupliers. Nouveau principe immédiat (la populine)." *Annales de chimie et de physique* **44**: 296-314.
- Braine, T. (2011). "Race against time to develop new antibiotics." *Bulletin of the World Health Organization* **89**: 88-89.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*, Éditions Tec et Doc.
- Burns, R. M. and Honkala, B. H. (1990). *Silvics of North America: 1. Conifers; 2. Hardwoods*, U.S. Department of Agriculture, Forest Service.
- Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J. V., Projan, S., Thomas, C. M., Tomasz, A., Tulkens, P. M., Walsh, T. R., Watson, J. D., Witkowski, J., Witte, W., Wright, G., Yeh, P. and Zgurskaya, H. I. (2011). "Tackling antibiotic resistance." *Nat. Rev. Microbiol.* **9**(12): 894-896.
- Butler, M. S. (2005). "Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials." *Nat. Prod. Rep.* **22**(2): 162-195.

- Butler, M. S. and Buss, A. D. (2006). "Natural products -- The future scaffolds for novel antibiotics?" *Biochem. Pharmacol.* **71**(7): 919-929.
- Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I. C., Harbarth, S., Jarlier, V., Levy, S. B., N'Doye, B., Pittet, D., Richtmann, R., Seto, W. H., van der Meer, J. W. M. and Voss, A. (2011). "Society's failure to protect a precious resource: antibiotics." *The Lancet* **378**(9788): 369-371.
- Carlet, J. and Mainardi, J. L. (2012). "Antibacterial agents: back to the future? Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin?" *Clin. Microbiol. Infec.* **18**(1): 1-3.
- Carlet, J., Rambaud, C., Pulcini, C. and on behalf of WAAR, i. s. o. t. A. C. I. d. d. B. M.-r. (2012). "WAAR (World Alliance against Antibiotic Resistance): Safeguarding antibiotics." *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **1**(1): 25.
- Chambost, B. V., Mcnutt, J. and Stuart, P. R. (2008). "Guided tour: Implementing the forest biorefinery (FBR) at existing pulp and paper mills." *Pulp and Paper Canada* **109**(7-8): 19-27.
- Chang, L.-C., Tsai, T.-R., Wang, J.-J., Lin, C.-N. and Kuo, K.-W. (1998). "The Rhamnose Moiety of Solamargine Plays a Crucial Role in Triggering Cell Death by Apoptosis." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**(1): 21-25.
- Chen, F., Liu, C.-J., Tschaplinski, T. J. and Zhao, N. (2009). "Genomics of Secondary Metabolism in *Populus*: Interactions with Biotic and Abiotic Environments." *Crit. Rev. Plant Sci.* **28**(5): 375-392.
- Choi, S., Kim, K., Kwon, J., Kim, S., Kim, H. and Lee, M. (2008). "Cytotoxic activities of diarylheptanoids from *Alnus japonica*." *Arch. Pharmacol. Res.* **31**(10): 1287-1289.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V. and Bertrand, M. (2005). "Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin." *Natural Product Research* **19**(7): 673-678.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V. and Bertrand, M. (2006). "Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin." *Natural Product Research* **20**(6): 531-536.
- Cichewicz, R. H. and Kouzi, S. A. (2004). "Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection." *Medicinal Research Reviews* **24**(1): 90-114.
- Coates, A. R. M., Halls, G. and Hu, Y. (2011). "Novel classes of antibiotics or more of the same?" *Br. J. Pharmacol.* **163**(1): 184-194.
- Conly, J. (2002). "Antimicrobial resistance in Canada." *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* **167**(8): 885-885.
- Conserva, L. M., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., Martinez V, J. C. and Gottlieb, H. E. (1990). "Iryantherins, lignoflavonoids of novel structural types from the myristicaceae." *Phytochemistry* **29**(12): 3911-3918.
- Copping, L. G. and Duke, S. O. (2007). "Natural products that have been used commercially as crop protection agents." *Pest Management Science* **63**: 524-554.
- Cornwell, P. A. and Barry, B. W. (1994). "Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil." *J. Pharm. Pharmacol.* **46**(4): 261-269.
- Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J. (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**(5): 343-356.
- Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J. (2011). "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* **38**(2): 99-107.
- Danner, H., Boeckler, G. A., Irmisch, S., Yuan, J. S., Chen, F., Gershenzon, J., Unsicker, S. B. and Köllner, T. G. (2011). "Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*." *Phytochemistry* **72**(9): 897-908.
- Davis, S. C. and Perez, R. (2009). "Cosmeceuticals and natural products: wound healing." *Clinics in Dermatology* **27**(5): 502-506.

- Dayan, F. E., Cantrell, C. L. and Duke, S. O. (2009). "Natural products in crop protection." *Biorg. Med. Chem.* **17**(12): 4022-4034.
- de Kraker, M. E. A., Davey, P. G., Grundmann, H. and on behalf of the, B. s. g. (2011). "Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe." *PLoS Med* **8**(10): e1001104.
- Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., Ng, C. S., Badmaev, V. and Kurzrock, R. (2008). "Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research* **14**(14): 4491-4499.
- Dickmann, D. I. (2001). An overview of the genus *Populus*. Poplar Culture in North America. D. I. Dickmann, J. G. Isebrands, J. E. Eckenwalder and J. Richardson. Ottawa, NRC Research Press: 1-42.
- Dillen, S. Y., Rood, S. B. and Ceulemans, R. (2010). Growth and Physiology. Genetics and Genomics of Populus. S. Jansson, R. Bhalerao and A. Groover, Springer New York. **8**: 39-63.
- Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P. and Demetzos, C. (2006). "Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**(3): 127-133.
- Donaldson, J. R., Stevens, M. T., Barnhill, H. R. and Lindroth, R. L. (2006). "Age-Related Shifts in Leaf Chemistry of Clonal Aspen (*Populus tremuloides*)." *J. Chem. Ecol.* **32**(7): 1415-1429.
- Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.-M. and 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." *J. Agric. Food. Chem.* **59**(9): 4527-4536.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.-E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C. and Legault, J. (2007). "Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius." *J. Ethnopharmacol.* **111**(1): 22-28.
- Eckenwalder, J. E. (1996). Systematics and evolution of *Populus*. Biology of Populus and its implications for Management and Conservation. R. R. Settler, J. Bradshaw, H.D., P. E. Heilman and T. M. Hinckley. Ottawa, Canada, NRC Research Press: 7-32.
- Ellis, B., Jansson, S., Strauss, S. and Tuskan, G. (2010). Why and How *Populus* Became a "Model Tree". Genetics and Genomics of Populus. S. Jansson, R. Bhalerao and A. Groover, Springer New York. **8**: 3-14.
- Elwood, P. C. (2001). "Aspirin: past, present and future." *CLINICAL MEDICINE-LONDON-ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS*- **1**(2): 132-137.
- Epstein, H. (2009). "Cosmeceuticals and polyphenols." *Clinics in Dermatology* **27**(5): 475-478.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T. and Tomás-Barberán, F. A. (2007). "Nutraceuticals: Facts and fiction." *Phytochemistry* **68**(22-24): 2986-3008.
- Fauci, A. S. and Morens, D. M. (2012). "The Perpetual Challenge of Infectious Diseases." *New England Journal of Medicine* **366**(5): 454-461.
- Fernandez, M., Breuil, C. and Watson, P. (2002). "Natural clonal variation of wood extractives in *Populus tremuloides*." *Can. J. Forest Res.* **32**(7): 1192-1199.
- Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C. and Murali, N. (2006). "Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction." *Energy & Fuels* **20**(4): 1727-1737.
- Finefield, J. M., Sherman, D. H., Kreitman, M. and Williams, R. M. (2012). "Enantiomeric Natural Products: Occurrence and Biogenesis." *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**(20): 4802-4836.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A. and Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Villas, Formatex Research Center. **1**: 481-493.

- Forest Products Association of Canada (2011). The New Face of the Canadian Forest Industry.
- Fowler, M. W. (2006). "Plants, medicines and man." *J. Sci. Food Agric.* **86**(12): 1797-1804.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., X. Li, H. P. H., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., J. A. Montgomery, J., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. and Fox, D. J. (2010). Gaussian 09, Revision C.01.
- Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nuñez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Debatin, K.-M. (1997). "Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors." *Cancer Research* **57**(21): 4956-4964.
- Fulda, S., Jeremias, I., Steiner, H. H., Pietsch, T. and Debatin, K.-M. (1999). "Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells." *International Journal of Cancer* **82**(3): 435-441.
- Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V. and Pichette, A. (2009). "Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins." *Biorg. Med. Chem.* **17**(5): 2002-2008.
- Gauthier, C., Legault, J., Lavoie, S., Rondeau, S., Tremblay, S. and Pichette, A. (2008). "Synthesis and Cytotoxicity of Bidesmosidic Betulin and Betulinic Acid Saponins." *J. Nat. Prod.* **72**(1): 72-81.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P. and Pichette, A. (2006). "Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents." *Biorg. Med. Chem.* **14**(19): 6713-6725.
- Ghedira, K., Goetz, P. and Le Jeune, R. (2009). "Propolis." *Phytothérapie* **7**(2): 100-105.
- Gibbons, S. (2004). "Anti-staphylococcal plant natural products." *Nat. Prod. Rep.* **21**(2): 263-277.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R. and Elseviers, M. (2005). "Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study." *The Lancet* **365**(9459): 579-587.
- Gootz, T. D. (2010). "The global problem of antibiotic resistance." *Crit. Rev. Immunol.* **30**(1): 79-93.
- Greenaway, W., English, S. and Whatley, F. (1990). "Phenolic composition of bud exudates of *Populus deltoides*." *Z. Naturforsch* **45**: 587-593.
- Greenaway, W., English, S. and Whatley, F. R. (1992a). "Relationships of *Populus × acuminata* and *Populus × generosa* with their parental species examined by gas chromatography – mass spectrometry of bud exudates." *Canadian Journal of Botany* **70**(1): 212-221.
- Greenaway, W., Gümüsdere, I. and Whatley, F. R. (1991). "Analysis of phenolics of bud exudate of *Populus euphratica* by GC-MS." *Phytochemistry* **30**(6): 1883-1885.
- Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. (1992b). "Compositions of bud and leaf exudates of some *Populus* species compared." *Zeitschrift für Naturforschung* **47**(5-6): 329-334.
- Greenaway, W., May, J. and Whatley, F. R. (1989). "Flavonoid aglycones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of *Populus balsamifera*." *J. Chromatogr.* **472**(2): 393-400.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. (1988). "Phenolic analysis of bud exudate of *Populus lasiocarpa* by GC/MS." *Phytochemistry* **27**(11): 3513-3515.
- Greenaway, W. and Whatley, F. (1990a). "Analysis of phenolics of bud exudate of *Populus angustifolia* by GC-MS." *Phytochemistry* **29**(8): 2551-2554.
- Greenaway, W. and Whatley, F. R. (1990b). "Resolution of complex mixtures of phenolics in poplar bud exudate by analysis of gas chromatography—mass spectrometry data." *J. Chromatogr. A* **519**(1): 145-158.

- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. and Tiemersma, E. (2006). "Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat." *The Lancet* **368**(9538): 874-885.
- Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F. and Potier, P. (1993). "Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships." *Acc. Chem. Res.* **26**(4): 160-167.
- H. Clark, J., E. I. Deswarte, F. and J. Farmer, T. (2009). "The integration of green chemistry into future biorefineries." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **3**(1): 72-90.
- Hämäläinen, S., Näyhä, A. and Pesonen, H.-L. (2011). "Forest biorefineries - a business opportunity for the Finnish forest cluster." *Journal of Cleaner Production* **In Press, Accepted Manuscript**.
- Harbilas, D., Brault, A., Vallerand, D., Martineau, L. C., Saleem, A., Arnason, J. T., Musallam, L. and Haddad, P. S. (2012). "Populus balsamifera L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model." *J. Ethnopharmacol.* **141**(3): 1012-1020.
- Harbilas, D., Martineau, L. C., Harris, C. S., Adeyiwola-Spoor, D. C. A., Saleem, A., Lambert, J., Caves, D., Johns, T., Prentki, M., Cuerrier, A., Arnason, J. T., Bennett, S. A. L. and Haddad, P. S. (2009). "Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II." *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* **87**(6): 479-492.
- Harvey, A. L. (2008). "Natural products in drug discovery." *Drug Discovery Today* **13**(19-20): 894-901.
- Hufford, C. D. and Oguntimein, B. O. (1980). "Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*." *Phytochemistry* **19**(9): 2036-2038.
- Hufford, C. D. and Oguntimein, B. O. (1982). "New Dihydrochalcones and Flavanones From *Uvaria Angolensis*." *J. Nat. Prod.* **45**(3): 337-342.
- Hufford, C. D., Oguntimein, B. O. and Shoolery, J. N. (1987). "Angoluvarin, an antimicrobial dihydrochalcone from *Uvaria angolensis*." *The Journal of Organic Chemistry* **52**(23): 5286-5288.
- Hughes, J. M. (2001). "Emerging Infectious Diseases: A CDC Perspective." *Emerging Infectious Diseases* **7**(3): 494.
- Isaeva, E. V. and Ryazanova, T. V. (2006). "Group composition of carbohydrates of poplar buds." *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*(1): 33-36.
- Isidorov, V. (2003). "GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*." *Zeitschrift für Naturforschung* **58**(5-6): 355-360.
- Isidorov, V. A. and Vinogorova, V. T. (2003). "GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*." *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **58**(5/6): 355-360.
- Jansson, S., Bhalerao, R. and Groover, A. (2010). *Genetics and genomics of Populus*, Springer.
- K. Sahu, N., S. Balbhadra, S., Choudhary, J. and V. Kohli, D. (2012). "Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review." *Current Medicinal Chemistry* **19**(2): 209-225.
- Kalinowska, M., Świsłocka, R. and Lewandowski, W. (2007). "The spectroscopic (FT-IR, FT-Raman and ¹H, ¹³C NMR) and theoretical studies of cinnamic acid and alkali metal cinnamates." *J. Mol. Struct.* **834-836**(0): 572-580.
- Kim, D. S. H. L., Chen, Z., Nguyen, v. T., Pezzuto, J. M., Qiu, S. and Lu, Z.-Z. (1997). "A Concise Semi-Synthetic Approach to Betulinic Acid from Betulin." *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **27**(9): 1607 - 1612.
- Kim, D. S. H. L., Pezzuto, J. M. and Pisha, E. (1998). "Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**(13): 1707-1712.
- Koehn, F. E. (2008). High impact technologies for natural products screening. *Natural Compounds as Drugs Volume I*, Birkhäuser Basel. **65**: 175-210.
- Koehn, F. E. and Carter, G. T. (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* **4**(3): 206-220.
- Komoda, Y. (1989). "Isolation of flavonoids from *Populus nigra* as o^e⁴-3-ketosteroid (5.a) reductase inhibitors." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **37**(11): 3128-3130.

- Koné, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D. and Dosso, M. (2004). "Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity." *J. Ethnopharmacol.* **93**(1): 43-49.
- Krasutsky, P. A. (2006). "Birch bark research and development." *Nat. Prod. Rep.* **23**(6): 919-942.
- Kren, V. and Martinkova, L. (2001). "Glycosides in Medicine: The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity" . *Current Medicinal Chemistry* **8**(11): 1303.
- Kuchukhidze, J., Jokhadze, M., Murtazashvili, T. and Mshvildadze, V. (2011). "Antioxidant polyphenols from *Populus alba* growing in Georgia." *Georgian medical news*(199): 94-97.
- Kumar, R. and Bhagat, N. (2012). "Ethnomedicinal plants of district Kathua (J&K)." *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **2**(4): 603-611.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. and Nakayama, T. (2004). "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins." *Food Chem.* **84**(3): 329-339.
- Kurkin, V. A., Dubishchev, A. V., Zapesochayaya, G. G., Titova, I. N., Braslavskii, V. B., Pravdivtseva, O. E., Ezhkov, V. N., Avdeeva, E. V., Petrova, E. S. and Klimova, I. Y. (2006). "Effect of phytopreparations containing phenylpropanoids on the physical activity of animals." *Pharm. Chem. J.* **40**(3): 149-150.
- Kurkin, V. A., Zapesochayaya, G. G. and Braslavskii, V. B. (1990). "Flavonoids of the buds of *Populus balsamifera*." *Chem. Nat. Compd.* **26**(2): 224-225.
- Kurtán, T., Antus, S. and Pescitelli, G. (2012). Electronic CD of Benzene and other Aromatic Chromophores for Determination of Absolute Configuration. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc.: 73-114.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C. and Scalbert, A. (2006). "Chlorogenic Acid Is Absorbed in Its Intact Form in the Stomach of Rats." *The Journal of Nutrition* **136**(5): 1192-1197.
- Lang, G., Mayhudin, N. A., Mitova, M. I., Sun, L., van der Sar, S., Blunt, J. W., Cole, A. L. J., Ellis, G., Laatsch, H. and Munro, M. H. G. (2008). "Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts." *J. Nat. Prod.* **71**(9): 1595-1599.
- Lapointe, M., Dunn, K., Tremblay-Coté, N., Bergeron, L.-P. and Ignaczak, L. (2006). Looking-Ahead: A 10-Year Outlook for the Canadian Labour Market (2006-2015). H. R. a. S. D. Canada. Gatineau: p. 82.
- Lavoie, S., Legault, J., Simard, F., Chiasson, É. and Pichette, A. (2013). "New antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*." *Tetrahedron Lett.* **54**(13): 1631-1633.
- Lee, H. J., Kim, J. S., Kim, Y.-K. and Ryu, J.-H. (2012). "Phenolic glycosides as inhibitors of inducible nitric oxide synthase from *Populus davidiana* in LPS-activated RAW 264.7 murine macrophages." *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **67**(10): 870-873.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A. and Madelmont, J.-C. (2003). "Antitumor Activity of Balsam Fir Oil: Production of Reactive Oxygen Species Induced by β -Humulene as Possible Mechanism of Action." *Planta Med* **69**(05): 402,407.
- Legault, J. and Pichette, A. (2007). "Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel." *J. Pharm. Pharmacol.* **59**(12): 1643-1647.
- Levin, E. D., Isaeva, E. V. and Cherepanova, V. E. (1990). "Arachidonic acid and prostaglandins in buds of *Populus balsamifera*." *Phytochemistry* **29**(7): 2325-2326.
- Ligon, B. L. (2004). "Penicillin: its discovery and early development." *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **15**(1): 52-57.
- Mabee, W., Gregg, D. and Saddler, J. (2005). "Assessing the emerging biorefinery sector in Canada." *Appl. Biochem. Biotechnol.* **123**(1): 765-778.
- Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazón, J. and Bonfill, M. (2011). "Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review." *Process Biochem.* **46**(1): 23-34.
- Marie-Victorin, F. (2002). *Flore Laurentienne*. Troisième Édition, Boucherville, Gaétan Morin Éditeur Ltée.

- Marles, R. J., Clavelle, C., Monteleone, L., Tays, N. and Burns, D. (1999). *Aboriginal Plant Use in Canada's Northwest Boreal Forest*, University of Washington Press.
- Martineau, L. C., Muhammad, A., Saleem, A., Hervé, J., Harris, C. S., Arnason, J. T. and Haddad, P. S. (2010). "Anti-adipogenic Activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* Bark Extracts, Part II: Bioassay-guided Identification of Actives Salicortin and Oregonin." *Planta Med* **76**(14): 1519-1524.
- Massow, F. and Smith, M. A. R. (1976). "Indirect ^{13}C - ^1H coupling in asymmetrically trisubstituted benzenes carbon-13 nuclear magnetic resonance study." *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*: 977-980.
- Mattes, B. R., Clausen, T. P. and Reichardt, P. B. (1987). "Volatile constituents of balsam poplar: The phenol glycoside connection." *Phytochemistry* **26**(5): 1361-1366.
- Mauldin, P. D., Salgado, C. D., Hansen, I. S., Durup, D. T. and Bosso, J. A. (2010). "Attributable Hospital Cost and Length of Stay Associated with Health Care-Associated Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria." *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(1): 109-115.
- Mazzio, E. A. and Soliman, K. F. A. (2009). "In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs." *Phytotherapy Research* **23**(3): 385-398.
- Mikaili, P., Sharifi, M., Sarahroodi, S. and Shayegh, J. (2012). "Pharmacological Review Of Medicinal Trees Spontaneous In Iran: A Historical And Modern Study." *Advances in Environmental Biology* **6**(1): 165-175.
- Moermann, D. E. (1998). *Native American Ethnobotany*, Timber Press, Inc.
- Morreel, K., Goeminne, G., Storme, V., Sterck, L., Ralph, J., Coppieters, W., Breyne, P., Steenackers, M., Georges, M., Messens, E. and Boerjan, W. (2006). "Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study." *The Plant Journal* **47**(2): 224-237.
- Mshvildadze, V., Legault, J., Lavoie, S., Gauthier, C. and Pichette, A. (2007). "Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*." *Phytochemistry* **68**(20): 2531-2536.
- Mulvey, M. R. and Simor, A. E. (2009). "Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?" *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* **180**(4): 408-415.
- Mustafa, K. A., Kjaergaard, H. G., Perry, N. B. and Weavers, R. T. (2003). "Hydrogen-bonded rotamers of 2',4',6'-trihydroxy-3'-formyldihydrochalcone, an intermediate in the synthesis of a dihydrochalcone from *Leptospermum recurvum*." *Tetrahedron* **59**(32): 6113-6120.
- Naasz, R., Caron, J., Legault, J. and Pichette, A. (2009). "Efficiency Factors for Bark Substrates: Biostability, Aeration, or Phytotoxicity." *Soil Sci. Soc. Am. J.* **73**(3): 780-791.
- Nagaoka, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Saiki, I. and Kadota, S. (2002). "Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-Metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line." *Biorg. Med. Chem.* **10**(10): 3351-3359.
- Naidoo, V., McGaw, L. J., Bisschop, S. P. R., Duncan, N. and Eloff, J. N. (2008). "The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens." *Veterinary Parasitology* **153**(3-4): 214-219.
- Natural Resources Canada. (2012). "*Balsam poplar*." Retrieved 5 février, 2013, from <http://tidcf.nrcan.gc.ca/trees/factsheet/53>.
- Navarro, V., Villarreal, M. L., Rojas, G. and Lozoya, X. (1996). "Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases." *J. Ethnopharmacol.* **53**(3): 143-147.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. (2003). "Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002." *J. Nat. Prod.* **66**(7): 1022-1037.
- Nichol, K. A., Adam, H. J., Hussain, Z., Mulvey, M. R., McCracken, M., Mataseje, L. F., Thompson, K., Kost, S., Lagacé-Wiens, P. R. S., Hoban, D. J. and Zhanel, G. G. (2011). "Comparison of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: results of the CANWARD 2007-2009 study." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **69**(3): 320-325.

- Nilsson, M. (1961). "Dihydrochalcones from the fronds of *Pityrogramma chrysophylla* var. *marginata* Domin." *Acta Chem. Scand.* **15**: 154-158.
- Noori, S., Hassan, Z. M., Mohammadi, M., Habibi, Z., Sohrabi, N. and Bayanolhagh, S. (2010). "Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo." *Cellular Immunology* **263**(2): 148-153.
- Norrby, R., Powell, M., Aronsson, B., Monnet, D. L., Lutsar, I., Bocsan, I., Stelian, Cars, O., Giamarellou, H. and Gyssens, I. C. (2009). The bacterial challenge: time to react. ECDC and EMA. Stockholm.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." *Eur. J. Biochem.* **267**(17): 5421-5426.
- Ogawa, Y., Oku, H., Iwaoka, E., Iinuma, M. and Ishiguro, K. (2006). "Allergy-Preventive Phenolic Glycosides from *Populus sieboldii*." *J. Nat. Prod.* **69**(8): 1215-1217.
- Omar, S., Lemonnier, B., Jones, N., Ficker, C., Smith, M. L., Neema, C., Towers, G. H. N., Goel, K. and Arnason, J. T. (2000). "Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine." *J. Ethnopharmacol.* **73**(1-2): 161-170.
- Pal, D., Singh, H. and Kumar, M. (2012). "A preliminary study on the in vitro antioxidant activity of seeds of *Aesculus indica* and barks of *Populus euphratica*." *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **4**(4): 249-250.
- Pan, H. and Lundgren, L. N. (1994). "Rhododendrol glycosides and phenyl glucoside esters from inner bark of *Betula pubescens*." *Phytochemistry* **36**(1): 79-83.
- Pant, H. M. (2010). "Study on Traditional Knowledge of Himalayan Medicinal Plants of Rath Region of Uttarakhand." *Research Journal of Agricultural Sciences* **1**(3): 277-279.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1959). "Studies on the Barks of the Family Salicaceae. I. Tremuloidin, a New Glucoside from the Bark of *Populus tremuloides*1." *J. Org. Chem.* **24**(6): 731-735.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1962). "Studies on the Barks of the Family Salicaceae. V.1 Grandidentatin, a New Glucoside from the Bark of *Populus grandidentata*." *J. Org. Chem.* **27**(5): 1806-1809.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1968a). "Studies on the barks of the family salicaceae-XVII. : Trichoside, a new glucoside from the bark of *Populus trichocarpa*." *Phytochemistry* **7**(5): 825-829.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1968b). "Studies on the barks of the family salicaceae—xix: Continued studies on the hot water extractives of *Populus balsamifera* bark." *Phytochemistry* **7**(10): 1851-1853.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1968c). "Studies on the barks of the family salicaceae—XX: Variations in the hot water extractives of *Populus balsamifera* bark." *Phytochemistry* **7**(10): 1855-1860.
- Pearl, I. A. and Darling, S. F. (1969). "Investigation of the hot water extractives of *Populus balsamifera* bark." *Phytochemistry* **8**(12): 2393-2396.
- Pedieu, R., Riedl, B. and Pichette, A. (2009). "Properties of mixed particleboards based on white birch (*Betula papyrifera*) inner bark particles and reinforced with wood fibres." *European Journal of Wood and Wood Products* **67**(1): 95-101.
- Pelter, A., Stainton, P. and Barber, M. (1965). "The mass spectra of oxygen heterocycles. II. The mass spectra of some flavonoids." *J. Heterocycl. Chem.* **2**(3): 262-271.
- Pichette, A., Lavoie, S., Morin, P., Mshvildadze, V., Lebrun, M. and Legault, J. (2006a). "New Labdane Diterpenes from the Stem Bark of *Larix laricina*." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **54**(10): 1429-1432.
- Pichette, A., Eftekhari, A., Georges, P., Lavoie, S., Mshvildadze, V. and Legault, J. (2010). "Cytotoxic phenolic compounds in leaf buds of *Populus tremuloides*." *Can. J. Chem.* **88**: 104-110.
- Pichette, A., Larouche, P.-L., Lebrun, M. and Legault, J. (2006b). "Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil." *Phytotherapy Research* **20**(5): 371-373.
- Pichette, A., Lavoie, S., Morin, P., Mshvildadze, V., Lebrun, M. and Legault, J. (2006c). "New Labdane Diterpenes from the Stem Bark of *Larix laricina*." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **54**(10): 1429-1432.

- Pichette, A., Legault, J. and Simard, F. (2012). Dihydrochalcone derivatives and their use as antibiotic agents. U. S. P. a. T. Office: 43.
- Pichette, A., Liu, H., Roy, C., Tanguay, S., Simard, F. and Lavoie, S. (2004). "Selective Oxidation of Betulin for the Preparation of Betulinic Acid, an Antitumoral Compound." *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **34**(21): 3925 - 3937.
- Pietarinen, S., Willför, S., Ahotupa, M., Hemming, J. and Holmbom, B. (2006a). "Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials." *Journal of Wood Science* **52**(5): 436-444.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Vikström, F. A. and Holmbom, B. R. (2006b). "Aspen Knots, a Rich Source of Flavonoids." *J. Wood Chem. Technol.* **26**(3): 245-258.
- Pieters, L. and Vlietinck, A. J. (2005). "Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?" *J. Ethnopharmacol.* **100**(1-2): 57-60.
- Piochon, M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. M. Sc., Université du Québec à Chicoutimi.
- Piochon, M., Legault, J., Gauthier, C. and Pichette, A. (2009). "Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural [alpha]-bisabolol [beta]-d-fucopyranoside and analogues." *Phytochemistry* **70**(2): 228-236.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.-S., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D., Brown, D. M., Wani, M. C., Wall, M. E., Hieken, T. J., Das Gupta, T. K. and Pezzuto, J. M. (1995). "Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis." *Nat Med* **1**(10): 1046-1051.
- Polyakov, V., Orlov, V., Shukenova, R. and Mullaeva, N. (1985). "Carboxylic acids of *Populus balsamifera*." *Chem. Nat. Compd.* **21**(6): 795-795.
- Potterat, O. and Hamburger, M. (2008). Drug discovery and development with plant-derived compounds. Natural Compounds as Drugs, Volume I, Birkhäuser Basel. **65**: 46-118.
- Rahman, M. (2011). "Chalcone: A valuable insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities." *Chemical Sciences Journal* **2011**(CSJ-29).
- Raman, A., Weir, U. and Bloomfield, S. F. (1995). "Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*." *Let. Appl. Microbiol.* **21**(4): 242-245.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I. and Fridlender, B. (2002). "Plants and human health in the twenty-first century." *Trends Biotechnol.* **20**(12): 522-531.
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T. and Savolainen, J. (2008). "Prodrugs: design and clinical applications." *Nature Reviews Drug Discovery* **7**(3): 255-270.
- Reichardt, P. B., Bryant, J. P., Mattes, B. R., Clausen, T. P., Chapin, F. S. and Meyer, M. (1990). "Winter chemical defense of Alaskan balsam poplar against snowshoe hares." *J. Chem. Ecol.* **16**(6): 1941-1959.
- Ríos, J. L. and Recio, M. C. (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." *J. Ethnopharmacol.* **100**(1-2): 80-84.
- Ritch-Krc, E. M., Thomas, S., Turner, N. J. and Towers, G. H. N. (1996). "Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use." *J. Ethnopharmacol.* **52**(2): 85-94.
- Rubiolo, P., Casetta, C., Cagliero, C., Brevard, H., Sgorbini, B. and Bicchi, C. (2013). "Populus nigra L. bud absolute: a case study for a strategy of analysis of natural complex substances." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**(4): 1223-1235.
- Saklani, A. and Kutty, S. K. (2008). "Plant-derived compounds in clinical trials." *Drug Discovery Today* **13**(3-4): 161-171.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A. and Salatino, M. L. F. (2011). "Propolis research and the chemistry of plant products." *Nat. Prod. Rep.* **28**(5): 925-936.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N. and Jabbar, A. (2010). "Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates." *Nat. Prod. Rep.* **27**(2): 238-254.

- Santamour, F. S. and Lundgren, L. N. (1997). "Rhododendrin in *Betula*: a reappraisal." *Biochem. Syst. Ecol.* **25**(4): 335-341.
- Santamour, J. F. S. and Lundgren, L. N. (1996). "Distribution and inheritance of platyphylloside in *Betula*." *Biochem. Syst. Ecol.* **24**(2): 145-156.
- Schnitzler, J. P., Louis, S., Behnke, K. and Loivamäki, M. (2010). "Poplar volatiles – biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids." *Plant Biology* **12**(2): 302-316.
- Scioneaux, A., Schmidt, M., Moore, M., Lindroth, R., Wooley, S. and Hagerman, A. (2011). "Qualitative Variation in Proanthocyanidin Composition of *Populus* Species and Hybrids: Genetics is the Key." *J. Chem. Ecol.* **37**(1): 57-70.
- Sentsov, M. F., Braslovskii, V. B., Kurkin, V. A., Zapesochnaya, G. G., Bakulin, V. T. and Pravdivtseva, O. E. (1997). "Comparative study of the component composition of buds of some *Populus* L. species with HPLC method." *Rastitel'nye Resursy* **33**(2): 51-56.
- Sforcin, J. M. (2007). "Propolis and the immune system: a review." *J. Ethnopharmacol.* **113**(1): 1-14.
- Sha, N., Guan, S.-H., Lu, Z.-Q., Chen, G.-T., Huang, H.-L., Xie, F.-B., Yue, Q.-X., Liu, X. and Guo, D.-A. (2009). "Cytotoxic Constituents of Chinese Propolis." *J. Nat. Prod.* **72**(4): 799-801.
- Shah, P. M. (2008). "Parenteral carbapenems." *Clinical Microbiology and Infection* **14**: 175-180.
- Shahidi, F. and Chandrasekara, A. (2010). "Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities." *Phytochemistry Reviews* **9**(1): 147-170.
- Sheldrick, G. M. (2008). "A short history of SHELX." *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **64**(1): 112-122.
- Si, C.-L., Kim, J.-K., Bae, Y.-S. and Li, S.-M. (2009). "Phenolic Compounds in the Leaves of *Populus ussuriensis* and their Antioxidant Activities." *Planta Med* **75**(EFirst): 1165-1167.
- Si, C.-L., Xu, J., Kim, J.-K., Bae, Y.-S., Liu, P.-T. and Liu, Z. (2011). "Antioxidant properties and structural analysis of phenolic glucosides from bark of *Populus ussuriensis* Kom." *Wood Sci Technol* **45**(1): 5-13.
- Simard, F., Legault, J., Lavoie, S., Mshvildadze, V. and Pichette, A. (2008). "Isolation and identification of cytotoxic compounds from the wood of *Pinus resinosa*." *Phytotherapy Research* **22**(7): 919-922.
- Simard, S., Hachey, J. M. and Collin, G. J. (1988). "The variations of essential oil composition during the extraction process. The case of *Thuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill." *J. Wood Chem. Technol.* **8**(4): 561-573.
- Slade, D., Ferreira, D. and Marais, J. P. J. (2005). "Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids." *Phytochemistry* **66**(18): 2177-2215.
- Slavov, G. T. and Zhelev, P. (2010). Salient Biological Features, Systematics, and Genetic Variation of *Populus*. Genetics and Genomics of *Populus*. S. Jansson, R. Bhalerao and A. Groover, Springer New York. **8**: 15-38.
- Smite, E., Lundgren, L. N. and Andersson, R. (1993). "Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pendula*." *Phytochemistry* **32**(2): 365-369.
- Smite, E., Pan, H. and Lundgren, L. N. (1995). "Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*." *Phytochemistry* **40**(1): 341-343.
- Smith, M. and Parkins, J. R. (2011). Community response to forestry transition in rural Canada: Analysis of media and census data for six case study communities in New Brunswick and British Columbia: 108 p.
- Spellberg, B., Blaser, M., Guidos, R. J., Boucher, H. W., Bradley, J. S., Eisenstein, B. I., Gerding, D., Lynfield, R., Reller, B. L., Rex, J., Schwartz, D., Septimus, E., Tenover, F. C. and Gilbert, D. N. (2011). "Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives." *Clinical Infectious Diseases* **52**(suppl 5): S397-S428.
- Stanton, B. J., B. Neale, D. and Li, S. (2010). *Populus* Breeding: From the Classical to the Genomic Approach. Genetics and Genomics of *Populus*. S. Jansson, R. Bhalerao and A. Groover, Springer New York. **8**: 309-348.

- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I. and Saito, I. (2002). "Green Coffee Bean Extract and Its Metabolites Have a Hypotensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats." *Hypertension Research* **25**(1): 99-107.
- Tanaka, H., Ichino, K. and Ito, K. (1984). "Dihydrochalcones from *Lindera umbellata*." *Phytochemistry* **23**(5): 1198-1199.
- Thornfeldt, C. (2005). "Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future." *Dermatologic Surgery* **31**(7): 873-880.
- Tian, Z., An, N., Zhou, B., Xiao, P., Kohane, I. and Wu, E. (2009). "Cytotoxic diarylheptanoid induces cell cycle arrest and apoptosis via increasing ATF3 and stabilizing p53 in SH-SY5Y cells." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **63**(6): 1131-1139.
- Tripathi, P. and Dubey, N. K. (2004). "Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables." *Postharvest Biology and Technology* **32**(3): 235-245.
- Tsai, C.-J., Harding, S. A., Tschaplinski, T. J., Lindroth, R. L. and Yinan, Y. (2006). "Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*." *New Phytol.* **172**(1): 47-62.
- Tsychiya, T., Suzuki, O. and Igarashi, D. (1996). "Protective Effects of Chlorogenic Acid on Paraquat-induced Oxidative Stress in Rats." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**(5): 765-768.
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. and Rokhsar, D. (2006). "The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)." *Science* **313**(5793): 1596-1604.
- Umezawa, T. (2010). "The cinnamate/monolignol pathway." *Phytochemistry Reviews* **9**(1): 1-17.
- Uprety, Y., Asselin, H., Dhakal, A. and Julien, N. (2012). "Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives." *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* **8**(1): 7.
- US-department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research. (2010). "Guidance for industry: Non-inferiority clinical trials." Retrieved 2013-03-03, 2013, from <http://www.fdanews.com/ext/files/NoninferiorityGuidance.pdf>.
- Van der Schyf, C. and Mabic, S. (2004). "Electron-Induced (EI) Mass Fragmentation is Directed by Intramolecular H-Bonding in Two Isomeric Benzodipyran Systems." *Molecules* **9**(10): 830-841.
- Van Hoof, L., Totté, J., Corthout, J., Pieters, L. A., Mertens, F., Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., Dommissie, R. and Esmans, E. (1989). "Plant Antiviral Agents, VI. Isolation of Antiviral Phenolic Glucosides from *Populus* Cultivar Beaupre by Droplet Counter-Current Chromatography." *J. Nat. Prod.* **52**(4): 875-878.
- Van Wyk, B.-E. and Wink, M. (2004). *Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses*, Timber Press (OR).

- Vardar-Ünlü, G., Silici, S. and Ünlü, M. (2008). "Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis." *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**(7): 1011-1017.
- Vogt, T. (2010). "Phenylpropanoid Biosynthesis." *Molecular Plant* **3**(1): 2-20.
- von Rudolph, E. and Grant, A. M. (1982). "Seasonal variation of the terpenes of the leaves, buds and twigs of alpine and balsam firs." *Can J Bot* **60**: 2682-2685.
- Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G. (2009). "Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals." *Phytomedicine* **16**(2-3): 97-110.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J. and Sforcin, J. M. (2011). "Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review." *J. Pharm. Pharmacol.* **63**(11): 1378-1386.
- Wavefunction Inc. Spartan'10. Irvine, CA 92612 (USA).
- Wetzel, S., Duchesne, L. and Laporte, M. F. (2006a). Nutraceuticals from the Forest. *Bioproducts from canada's forests*: 113-130.
- Wetzel, S., Duchesne, L. C. and Laporte, M. F. (2006b). Nutraceuticals from the Forest. *Bioproducts from canada's forests*: 113-130.
- Wetzel, S., Duchesne, L. C. and Laporte, M. F. (2006c). Pharmaceuticals from the Forest. *Bioproducts from canada's forests*: 131-146.
- Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology." *Plant Physiology* **126**(2): 485-493.
- Winter, M. and Herrmann, K. (1986). "Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables." *J. Agric. Food. Chem.* **34**(4): 616-620.
- Wohlmuth, H., Deseo, M. A., Brushett, D. J., Thompson, D. R., MacFarlane, G., Stevenson, L. M. and Leach, D. N. "Diarylheptanoid from *Pleuranthodium racemigerum* with in Vitro Prostaglandin E2 Inhibitory and Cytotoxic Activity." *J. Nat. Prod.* **73**(4): 743-746.
- Xiao, Y., Ng, S.-C., Tan, T. T. Y. and Wang, Y. (2012). "Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography." *J. Chromatogr. A* **1269**(0): 52-68.
- Yang, N.-Y., Liu, L., Tao, W.-W., Duan, J.-A. and Tian, L.-J. (2010). "Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells." *Phytochemistry* **71**(13): 1528-1533.
- Zahir, A., Rahuman, A., Bagavan, A., Santhoshkumar, T., Mohamed, R., Kamaraj, C., Rajakumar, G., Elango, G., Jayaseelan, C. and Marimuthu, S. (2010). "Evaluation of botanical extracts against *Haemaphysalis bispinosa* Neumann and *Hippobosca maculata* Leach." *Parasitology Research* **107**(3): 585-592.
- Zahir, A., Rahuman, A., Kamaraj, C., Bagavan, A., Elango, G., Sangaran, A. and Kumar, B. (2009). "Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control." *Parasitology Research* **105**(2): 453-461.
- Zhang, X., Hung, T., Phuong, P., Ngoc, T., Min, B.-S., Song, K.-S., Seong, Y. and Bae, K. (2006a). "Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*." *Arch. Pharmacol. Res.* **29**(12): 1102-1108.
- Zhang, X., Thuong, P. T., Min, B.-S., Ngoc, T. M., Hung, T. M., Lee, I. S., Na, M., Seong, Y.-H., Song, K.-S. and Bae, K. (2006b). "Phenolic Glycosides with Antioxidant Activity from the Stem Bark of *Populus davidiana*." *J. Nat. Prod.* **69**(9): 1370-1373.
- Zhang, Y. H. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**(5): 367-375.
- Zhao, J., Pang, Y. and Dixon, R. A. (2010). "The Mysteries of Proanthocyanidin Transport and Polymerization." *Plant Physiology* **153**(2): 437-443.
- Zhi-da, M., Murata, H., Mizuno, M., Kojima, H., Tanaka, T., Inuma, M. and Kimura, R. (1987). "Phenolic constituents from seeds of *Coptis japonica* var. *dissecta*." *Phytochemistry* **26**(7): 2071-2074.
- Zhong, L., Zhou, L., Zhou, Y., Chen, Y., Sui, P., Wang, J. and Wang, M. (2012). "Antimicrobial flavonoids from the twigs of *Populus nigra* × *Populus deltoides*." *Natural Product Research* **26**(4): 307-313.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C. and Formelli, F. (2002). "Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells." *Cancer Letters* **175**(1): 17-25.

ANNEXE 1

PRINCIPES DES TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES UTILISÉES

Certaines des techniques utilisées dans le cadre de ce projet de thèse sont des techniques classiques de la chimie organique. Les techniques de séparation tels que la chromatographie sur couche mince, la chromatographie sur colonne ouverte, la chromatographie « flash » et la chromatographie liquide haute performance sont des méthodes largement utilisées qui ne nécessitent pas d'en expliquer les principes en détail. Certaines méthodes utilisées pour la caractérisation des composés comme la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) et du carbone (RMN ^{13}C), la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie UV-visible et la spectrométrie de masse, sont aussi bien connues des chimistes. Les principes de ces méthodes ne seront pas non plus exposés ici. Certaines méthodes utilisées lors de la détermination de la configuration absolue des composés isolés, tel que la spectroscopie de dichroïsme circulaire (ECD) et le calcul de spectres ECD ont des utilisations plus restreintes. Voici les principes derrière ces deux méthodes.

SPECTROSCOPIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE

La spectroscopie ECD fait appel à des principes apparentés à ceux du pouvoir rotatoire ou de la dispersion rotatoire optique. Lorsqu'une lumière polarisée linéairement traverse une solution contenant une molécule chirale, le plan de la transmission de cette lumière subit une rotation. Ce phénomène s'explique par le fait que l'indice de réfraction pour la lumière polarisée à droite est différent de celui de la lumière polarisée à gauche. Dans le cas de la spectroscopie ECD, c'est plutôt la différence d'absorptivité molaire d'un composé pour la lumière polarisée circulairement à gauche et la lumière polarisée circulairement à droite qui est mise à profit. La présence d'un ou de plusieurs centres chiraux sur une molécule possédant des groupements chromophores est à la base de ce phénomène. Le résultat observable est l'induction d'une ellipticité dans la polarisation de la lumière. L'angle de l'ellipticité induite peut être mesuré en fonction de la longueur d'onde pour toutes les bandes d'absorption du composé étudié et un spectre ECD peut ainsi être généré. Il est important de noter que deux énantiomères induiront une ellipticité

inverse générant donc des bandes de signes inverses (+ ou -) sur leurs spectres respectifs. La spectroscopie ECD est un outil pratique pour l'étude des composés chiraux puisque les signes des bandes d'absorption peuvent être corrélés à leur configuration absolue.

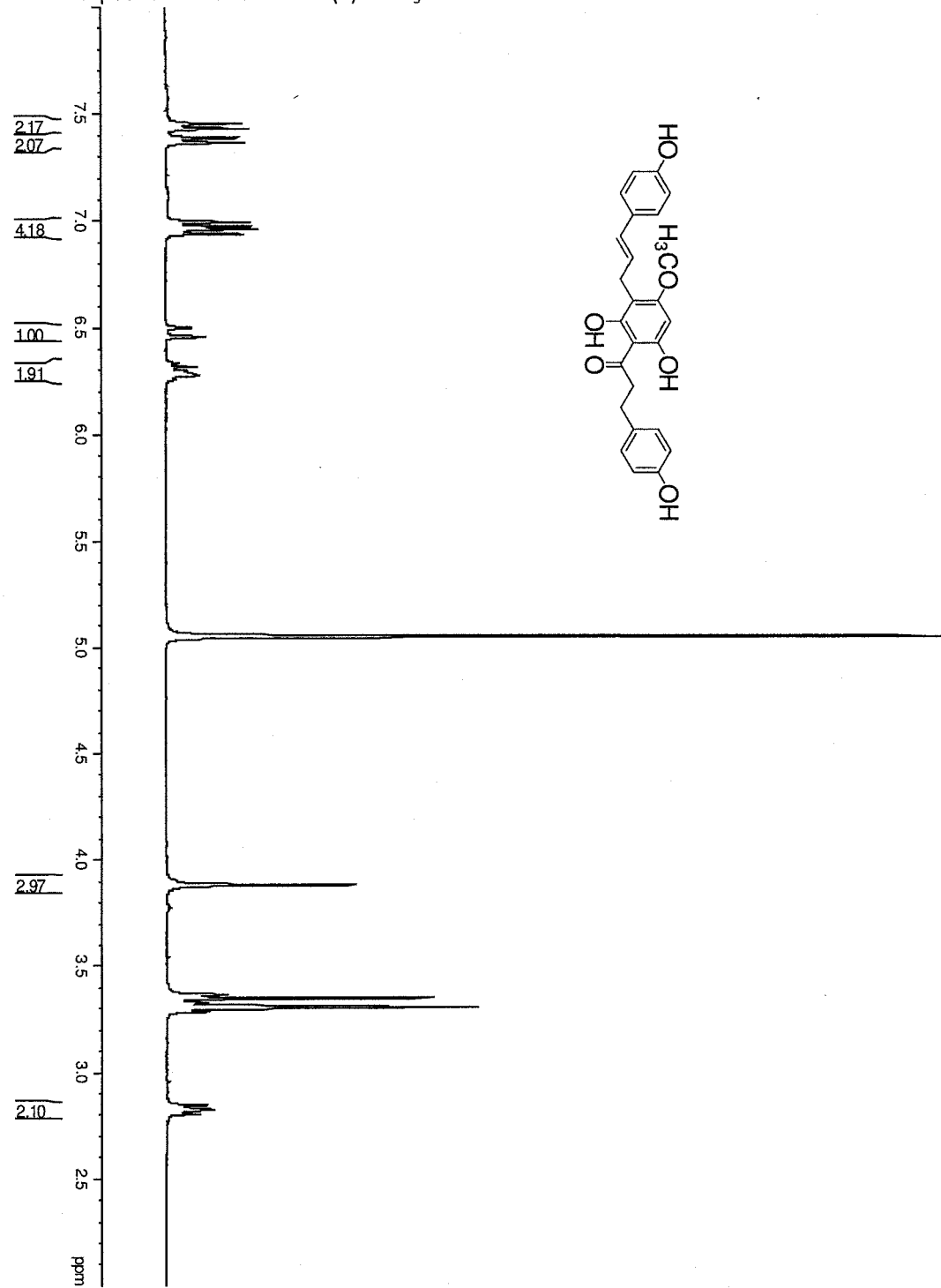
CALCULS DE SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE

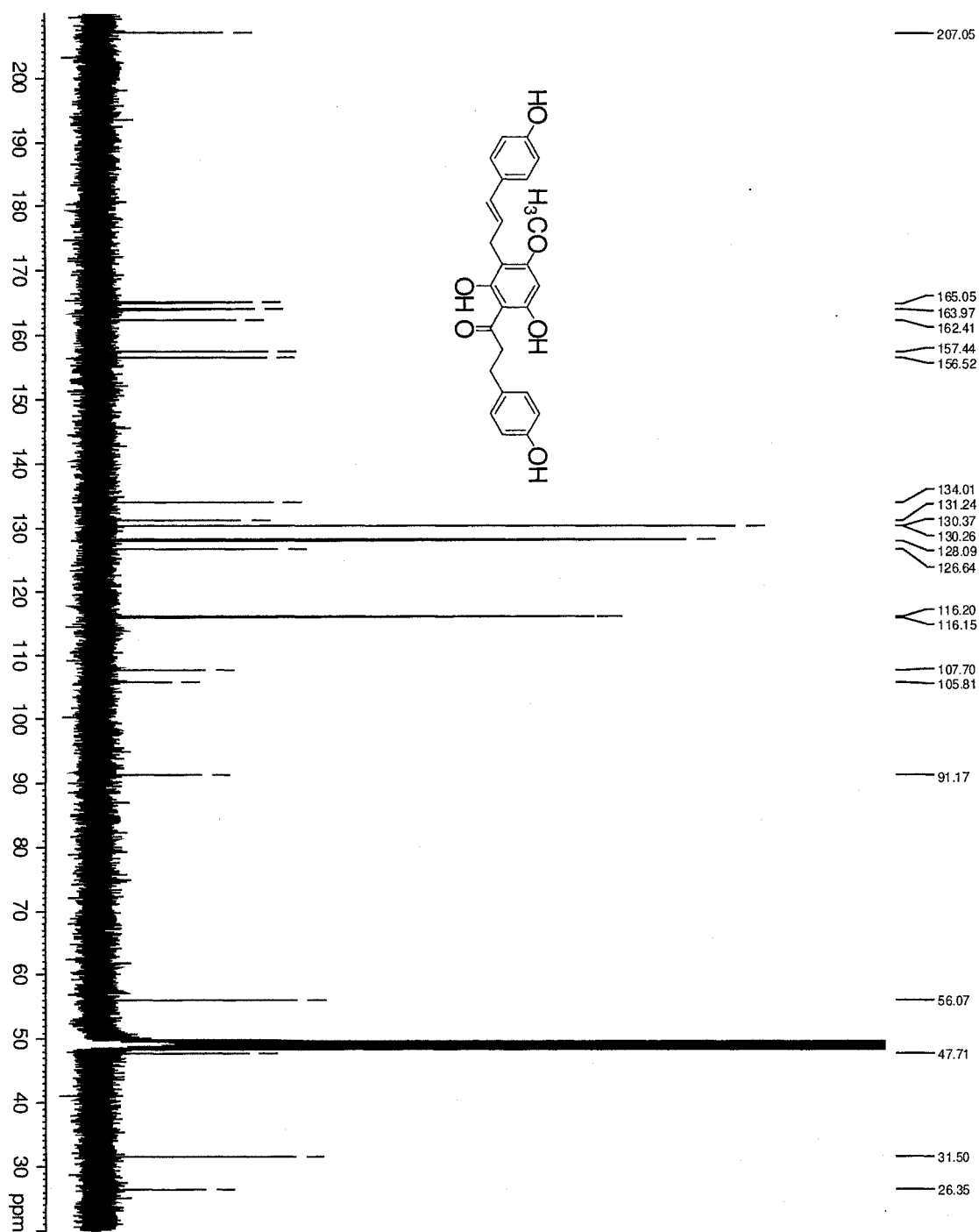
Bien que l'apparence du spectre ECD d'un composé soit corrélée à sa configuration absolue, il est difficile d'établir des relations générales permettant d'en déduire directement la configuration absolue. Il existe des règles empiriques qui ont été établies expérimentalement grâce à l'étude de variations structurales sur un même chromophore. Un bon exemple est le noyau « chroman », présent chez les flavonoïdes, pour lequel la configuration de l'hétérocycle pyranique peut être déduite à partir d'un spectre ECD. Malheureusement, la présence d'un substituant ou d'un chromophore pour lequel il n'y a pas de données expérimentales disponibles rend impossible l'utilisation de ces règles. Une nouvelle technique utilisée pour tirer profit de l'information des spectres ECD consiste à générer des spectres ECD théoriques. En effet, avec l'évolution des capacités de calculs sur les supports informatiques, il est devenu possible de prédire certaines propriétés des composés organiques à partir de méthodes *ab initio*, c'est-à-dire sans l'utilisation de données expérimentales. Des versions simplifiées de l'équation de Schrödinger sont utilisées pour décrire les différentes interactions des particules dans un composé organique donné. On peut par exemple prédire de cette façon les différentes transitions électroniques d'un composé donné et en tirer un spectre UV théorique. Le même principe peut être appliqué pour générer des spectres de dichroïsme circulaire. La stratégie adoptée pour arriver à déterminer la configuration absolue d'un composé donné par cette méthode est de générer les spectres ECD théoriques des différents isomères possibles (diastéréoisomères ou énantiomères) de ce composé et de comparer ces spectres à celui obtenu expérimentalement. Lorsque les calculs sont effectués avec succès, une bonne corrélation est observée entre le spectre expérimental et un des spectres théoriques générés. Dans ce cas, la configuration absolue du composé utilisé pour générer ce spectre est aussi celle du composé étudié. Il est important de mentionner que la conformation du composé étudié en solution peut avoir un impact sur l'apparence finale

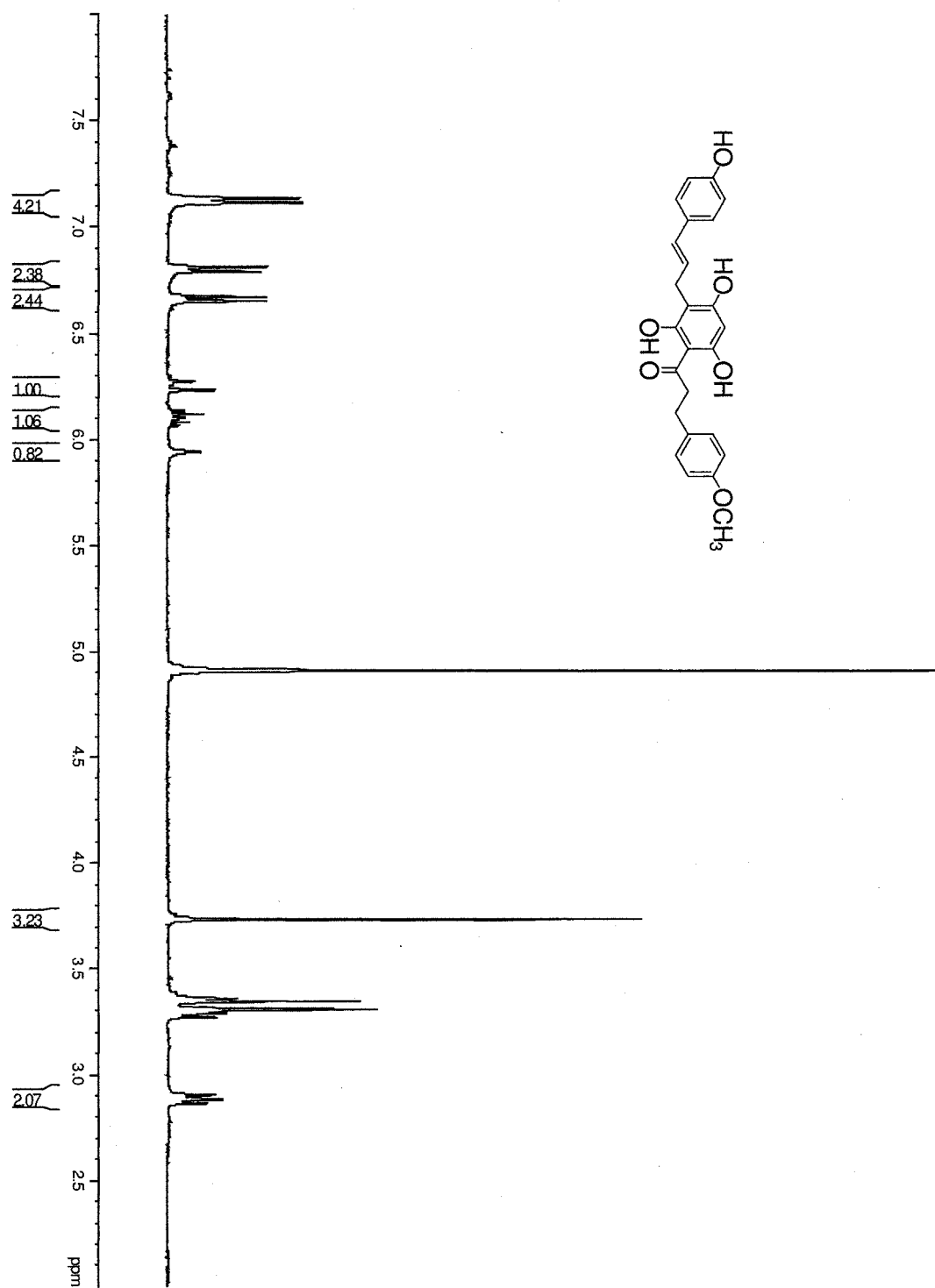
du spectre ECD. Une étude des conformères les plus stables des différents isomères considérés doit donc être effectuée préalablement et les calculs théoriques sont effectués pour chacun des conformères. Dans le cadre des travaux de cette thèse, la théorie de la fonction de la densité électronique a été utilisée pour effectuer les calculs.

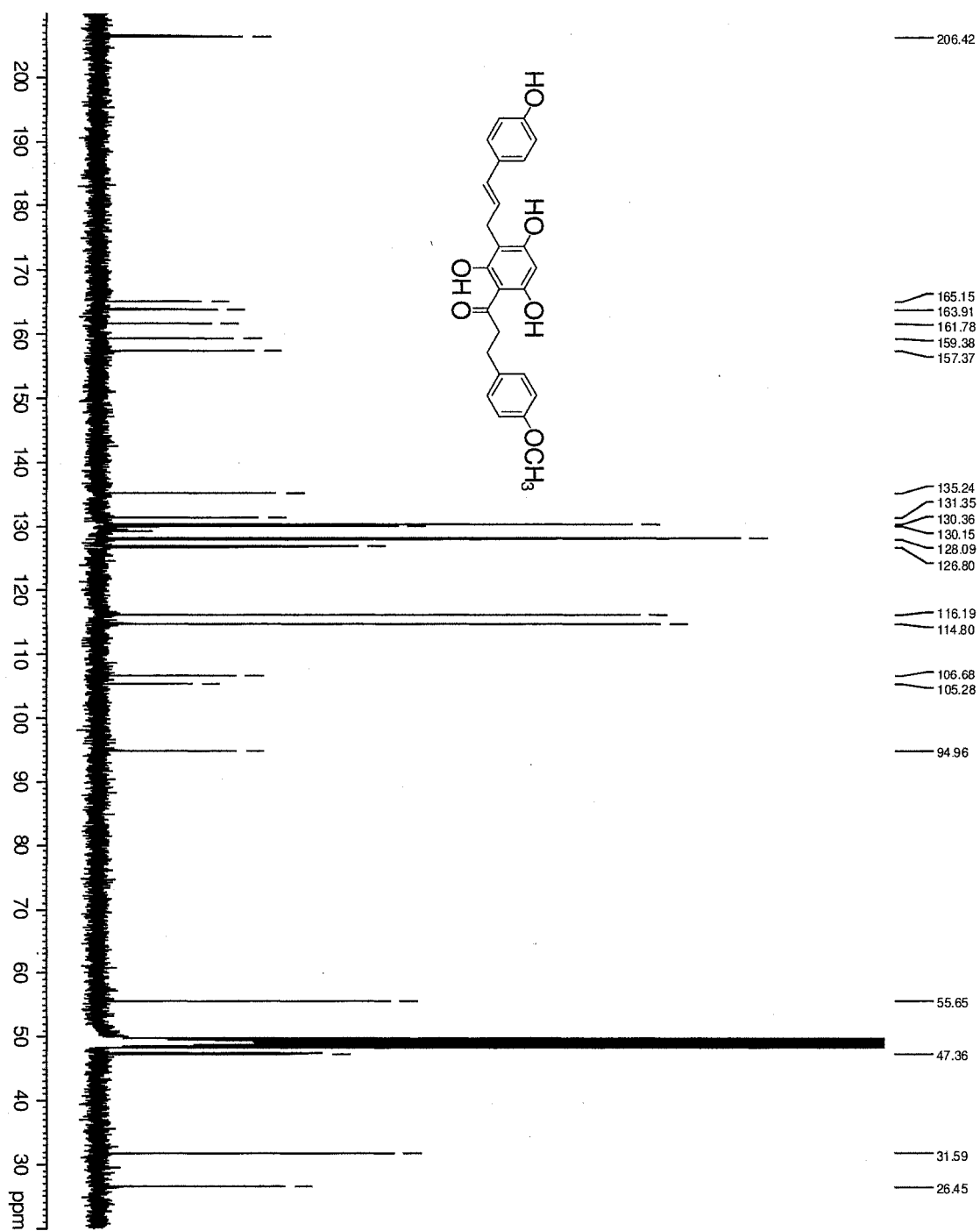
ANNEXE 2
SPECTRE RMN ^1H ET ^{13}C

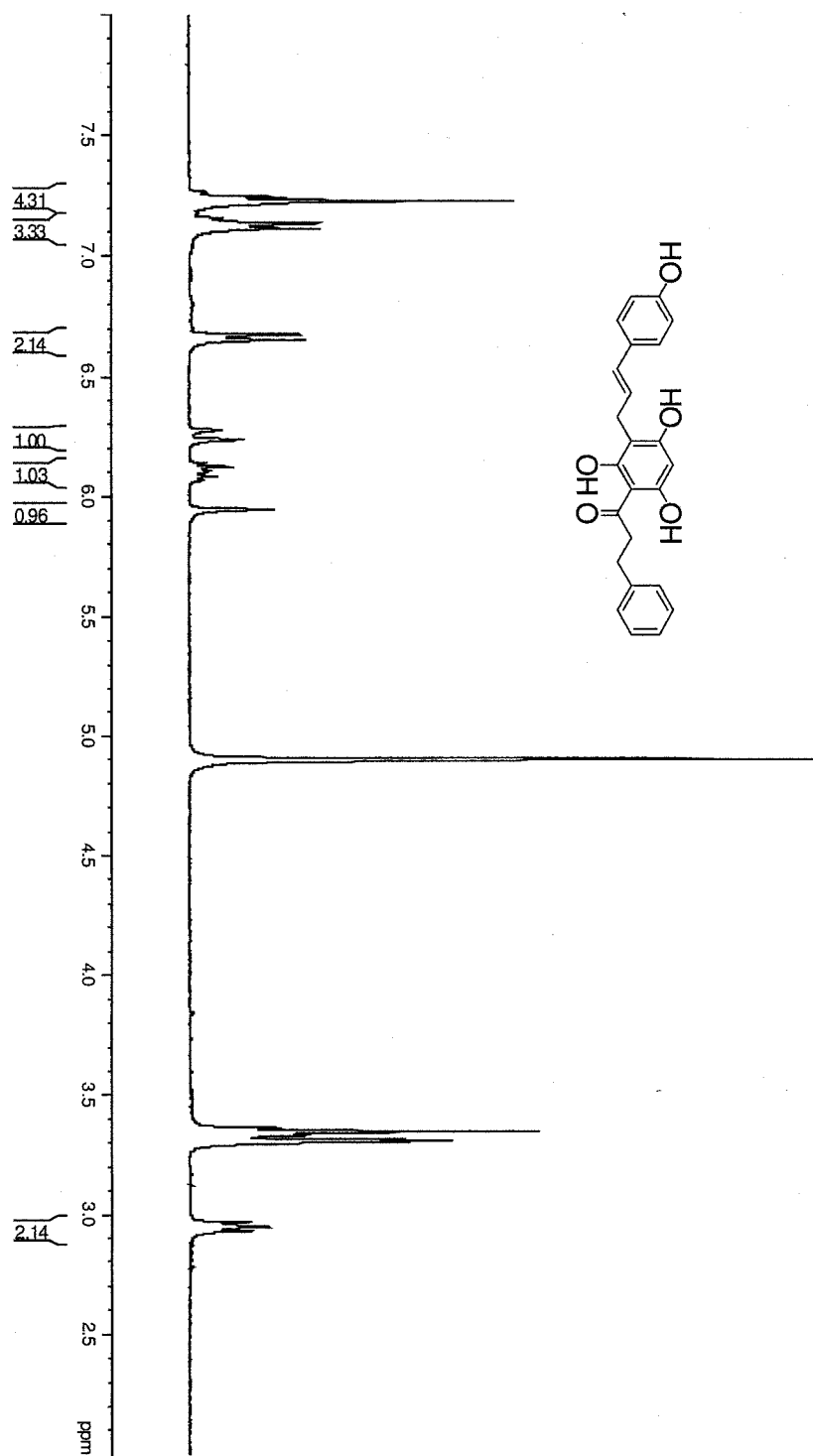
^1H NMR spectrum of balsacone A (1) in CD_3OD

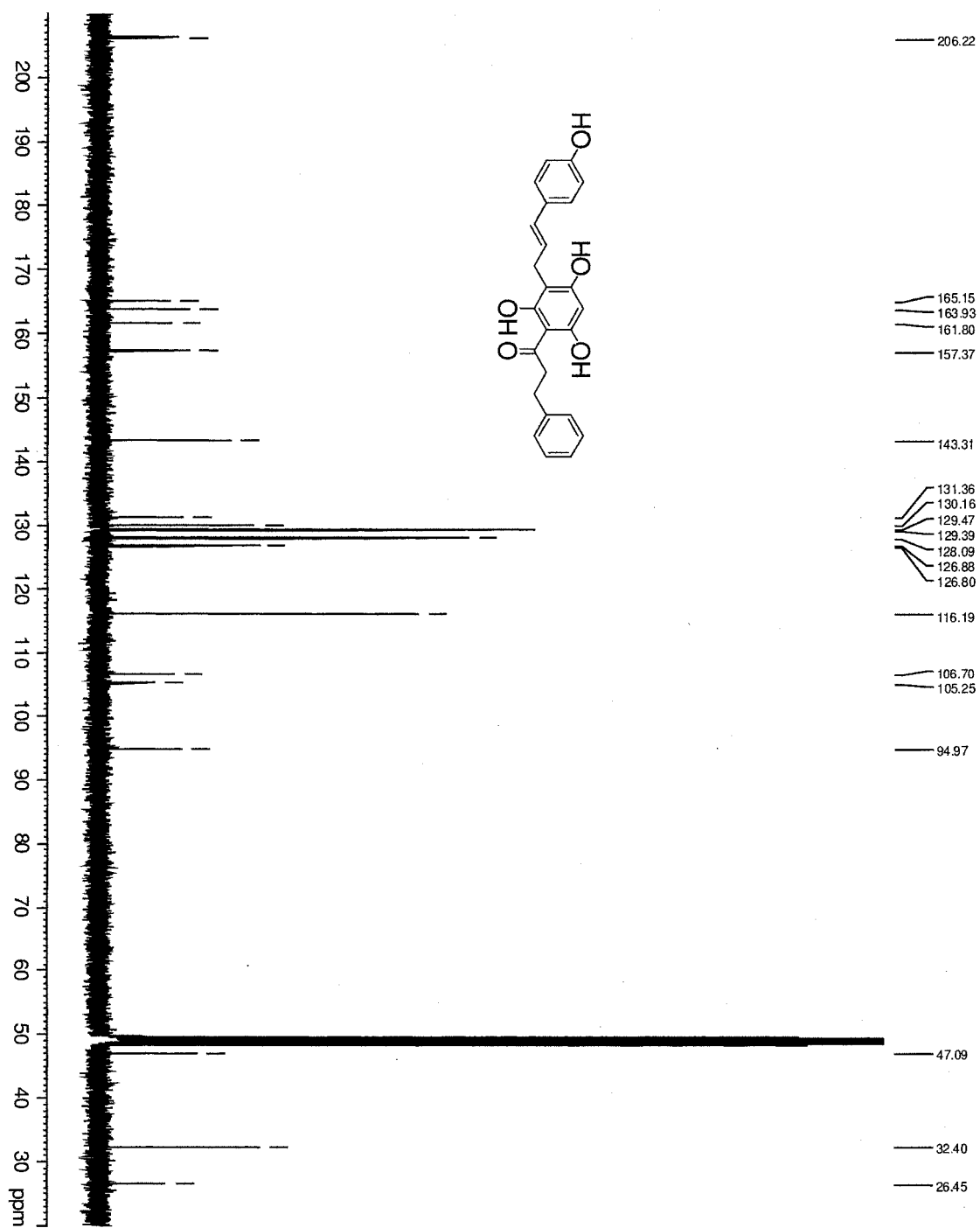


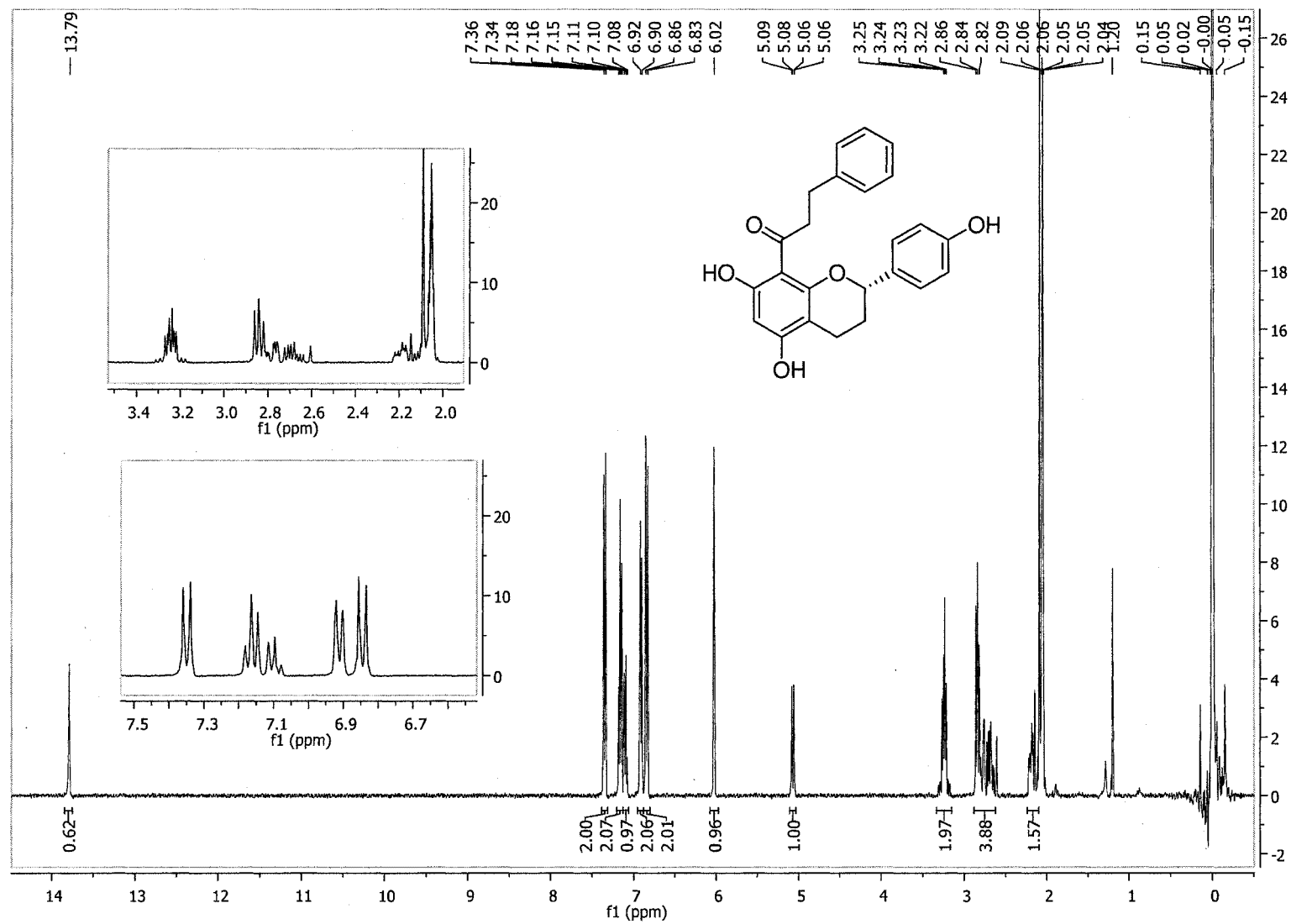
^{13}C NMR spectrum of balsacone A (**1**) in CD_3OD 

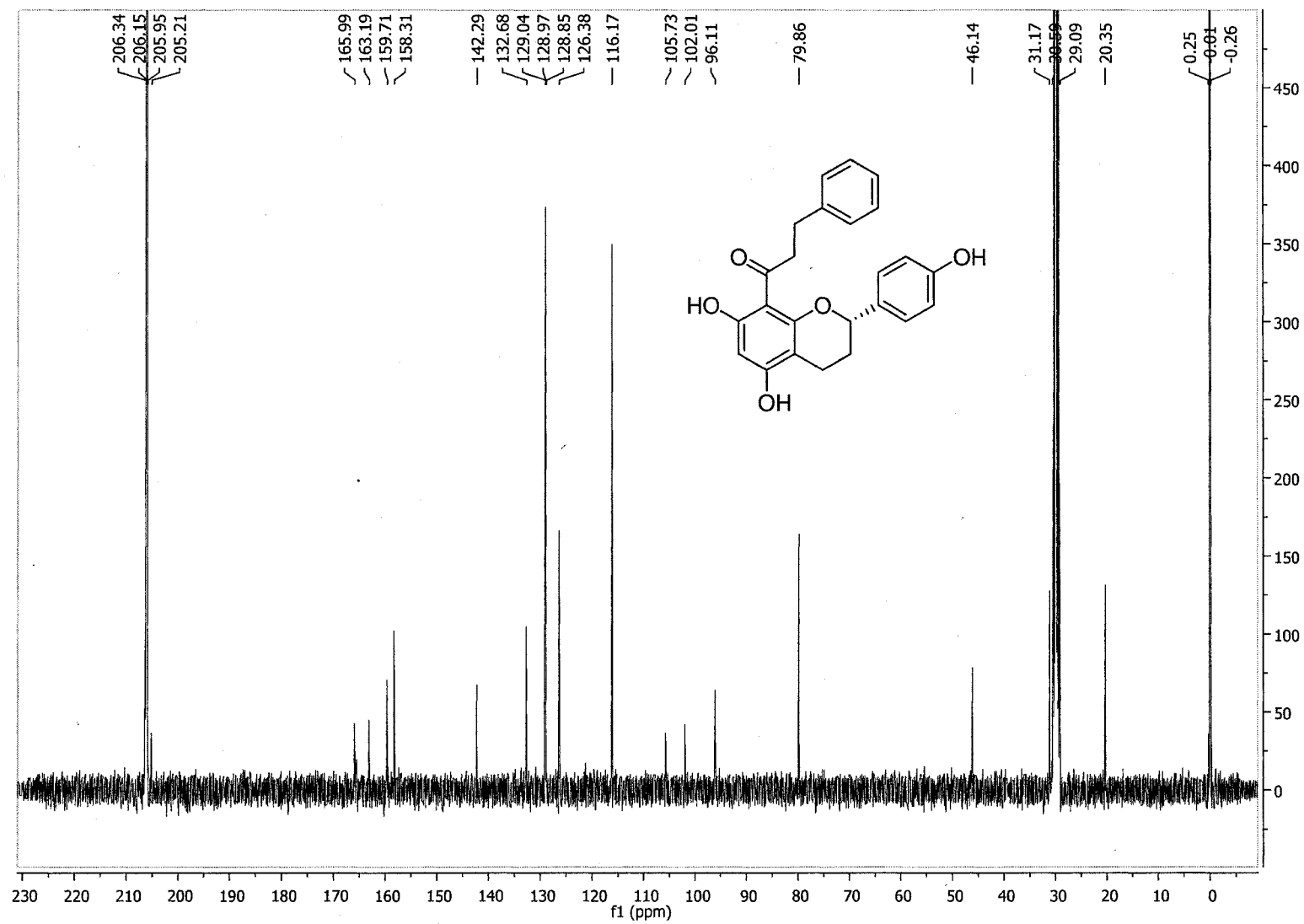
^1H NMR spectrum of balsacone B (**2**) in CD_3OD 

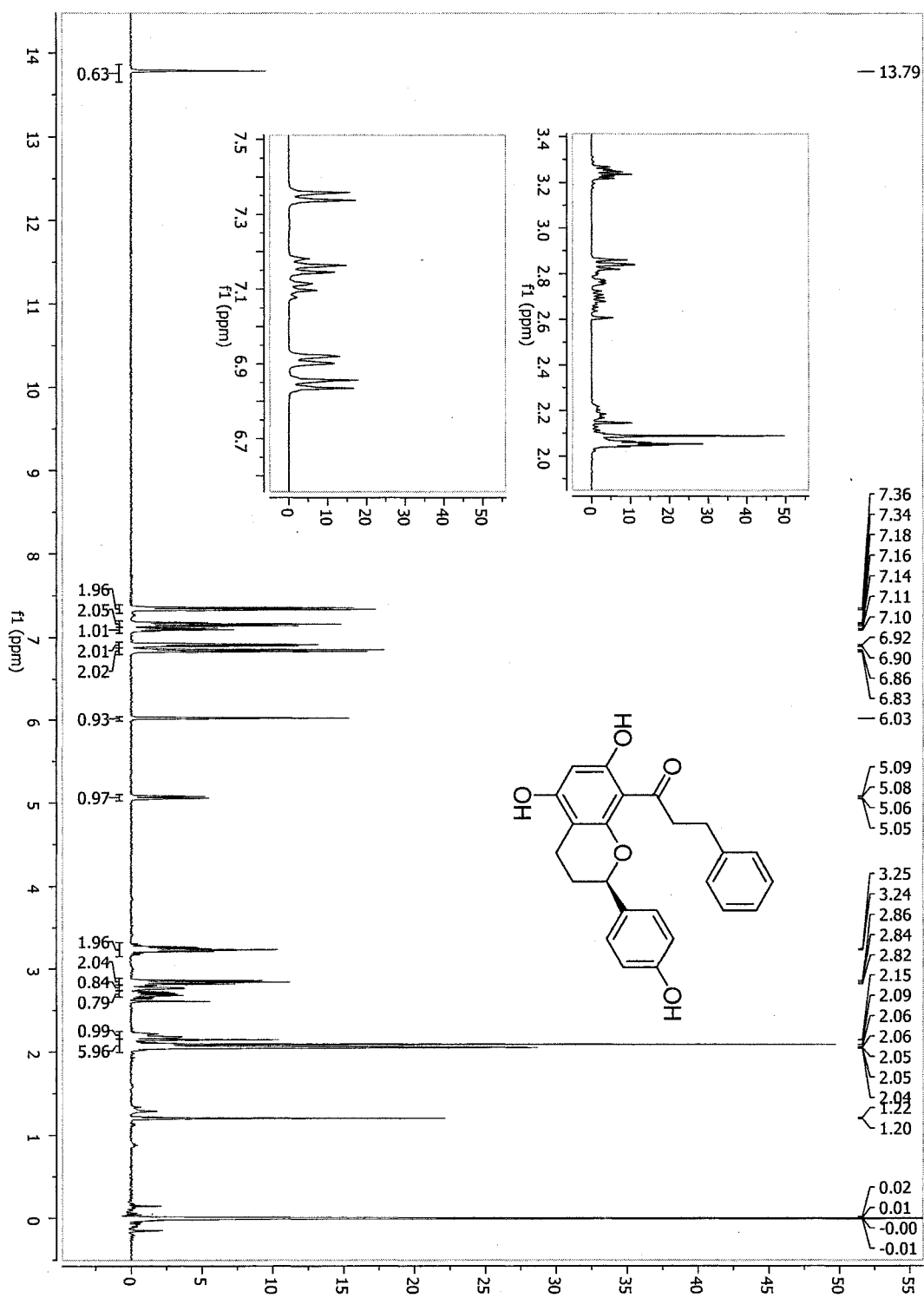
^{13}C NMR spectrum of balsacone B (**2**) in CD_3OD 

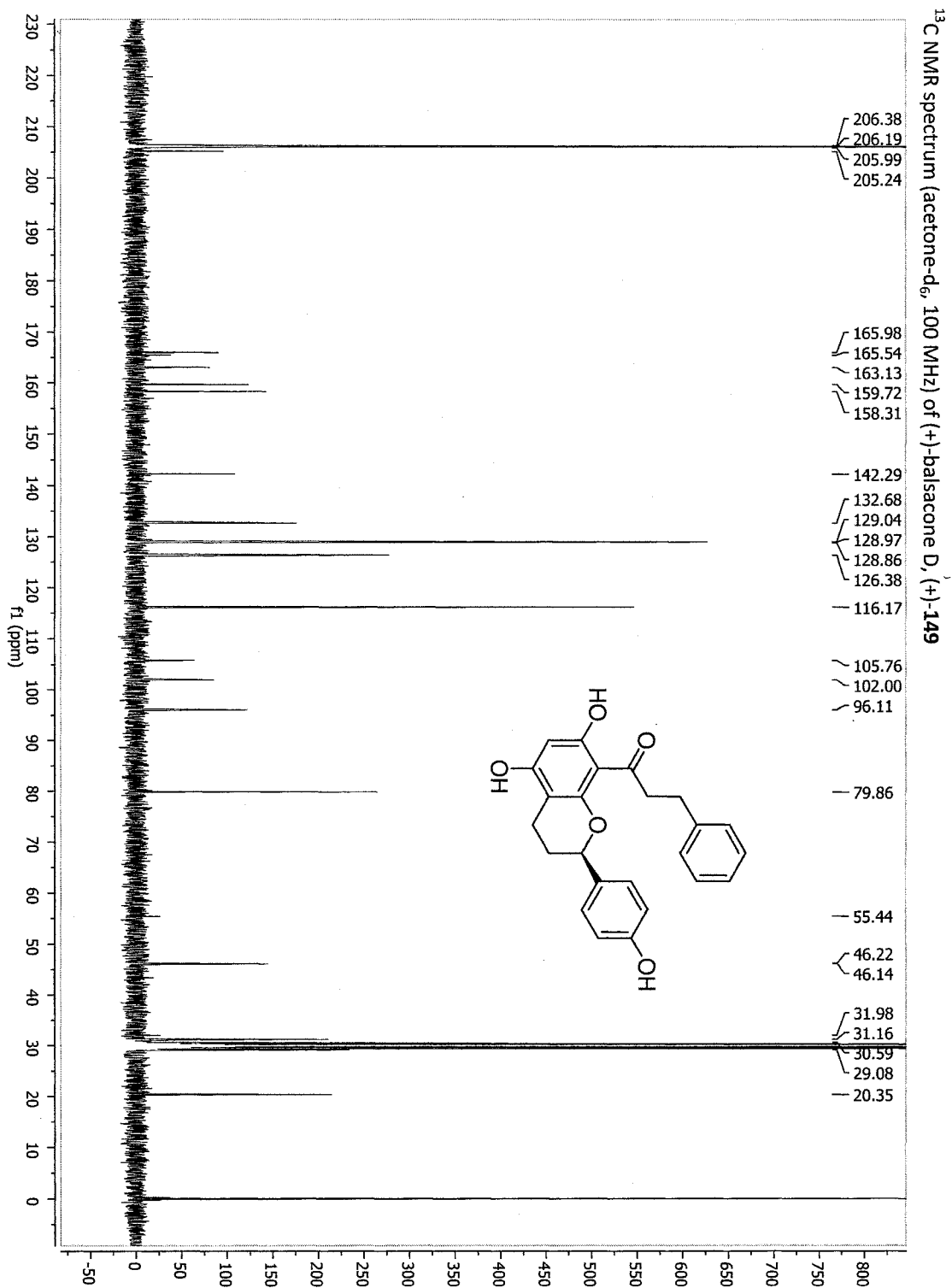
^1H NMR spectrum of balsacone C (3) in CD_3OD 

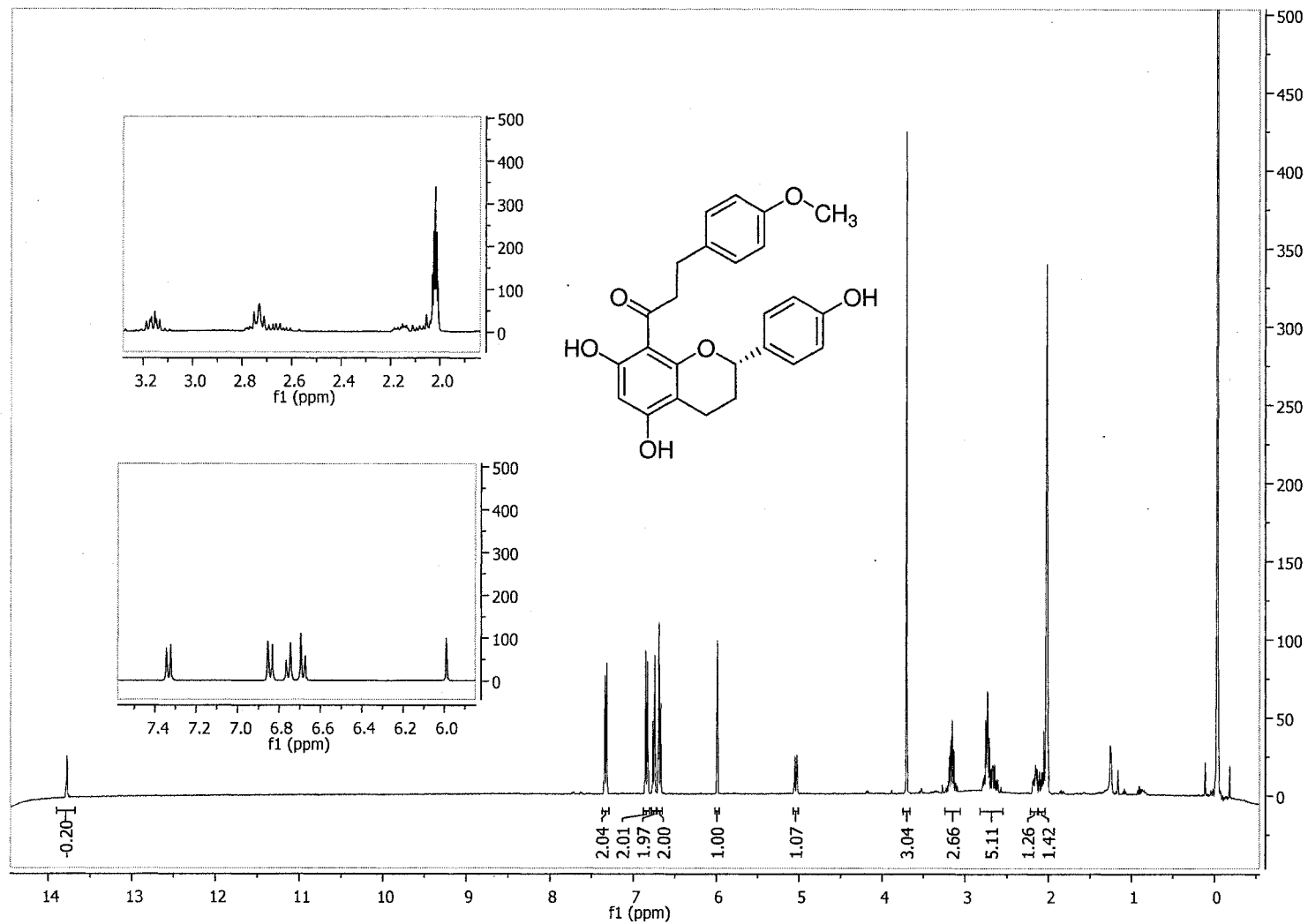
^{13}C NMR spectrum of balsacone C (3) in CD_3OD 

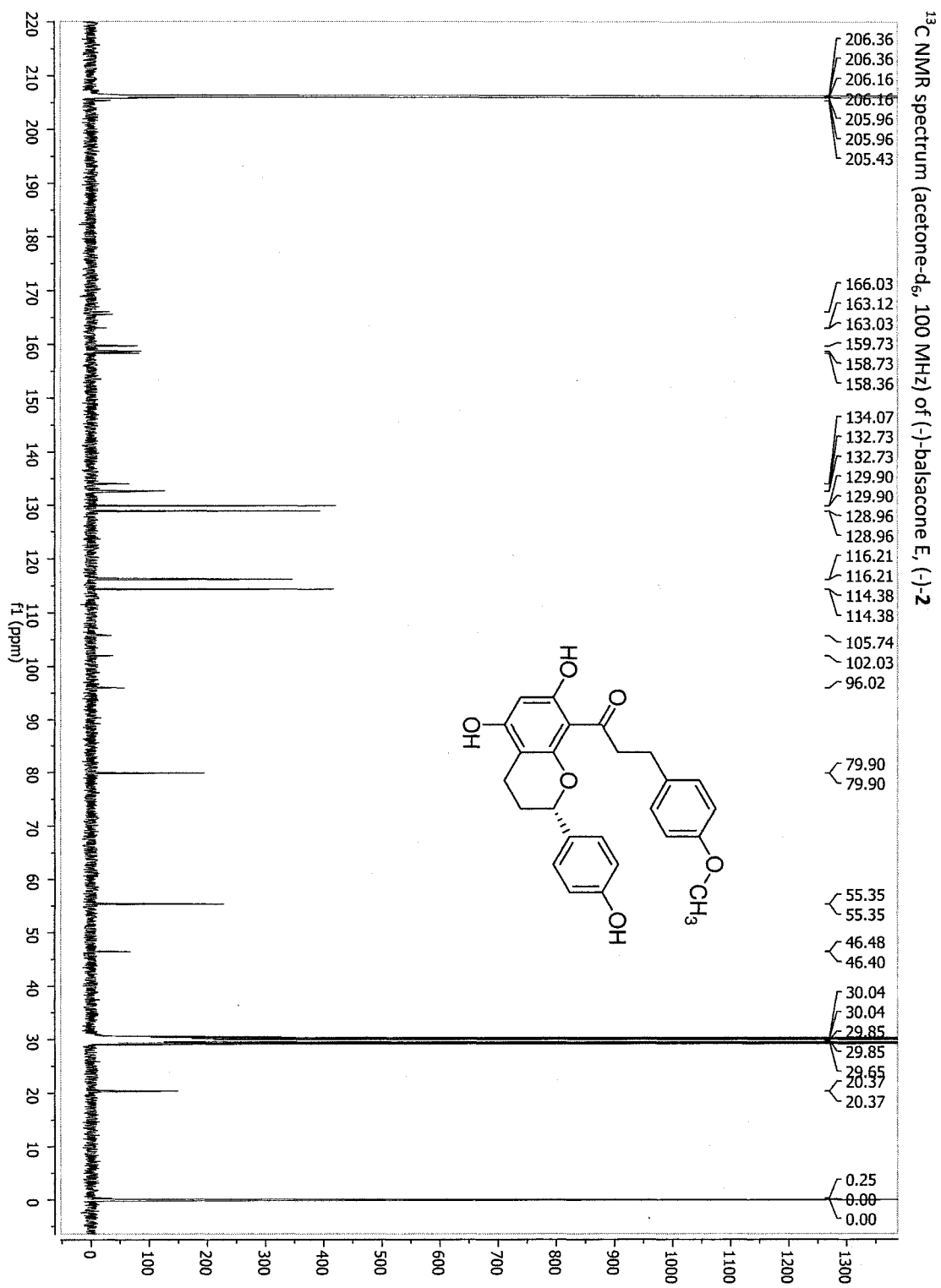
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (-)-balsacone D, (-)-149

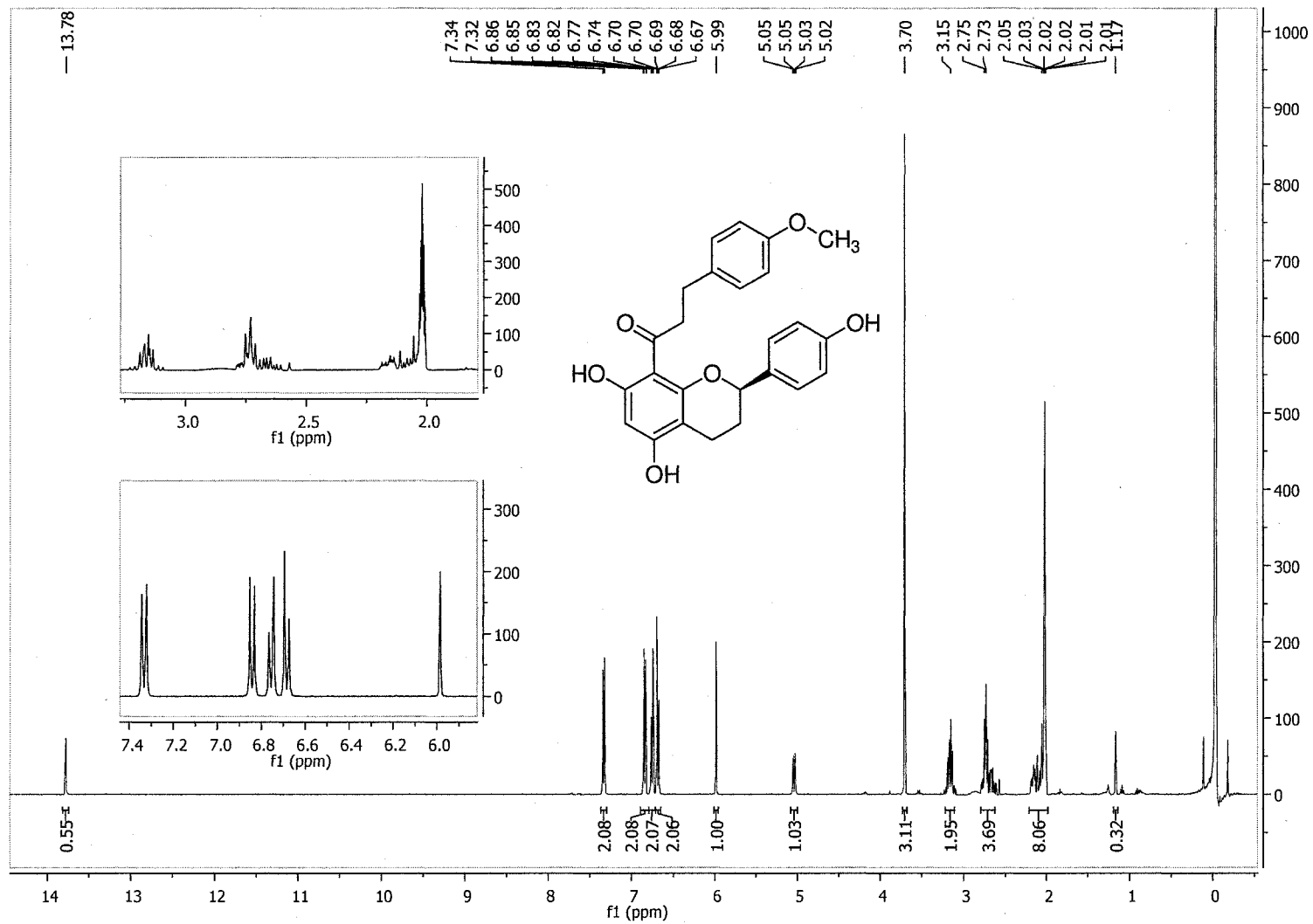
^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (-)-balsacone D, (-)-149

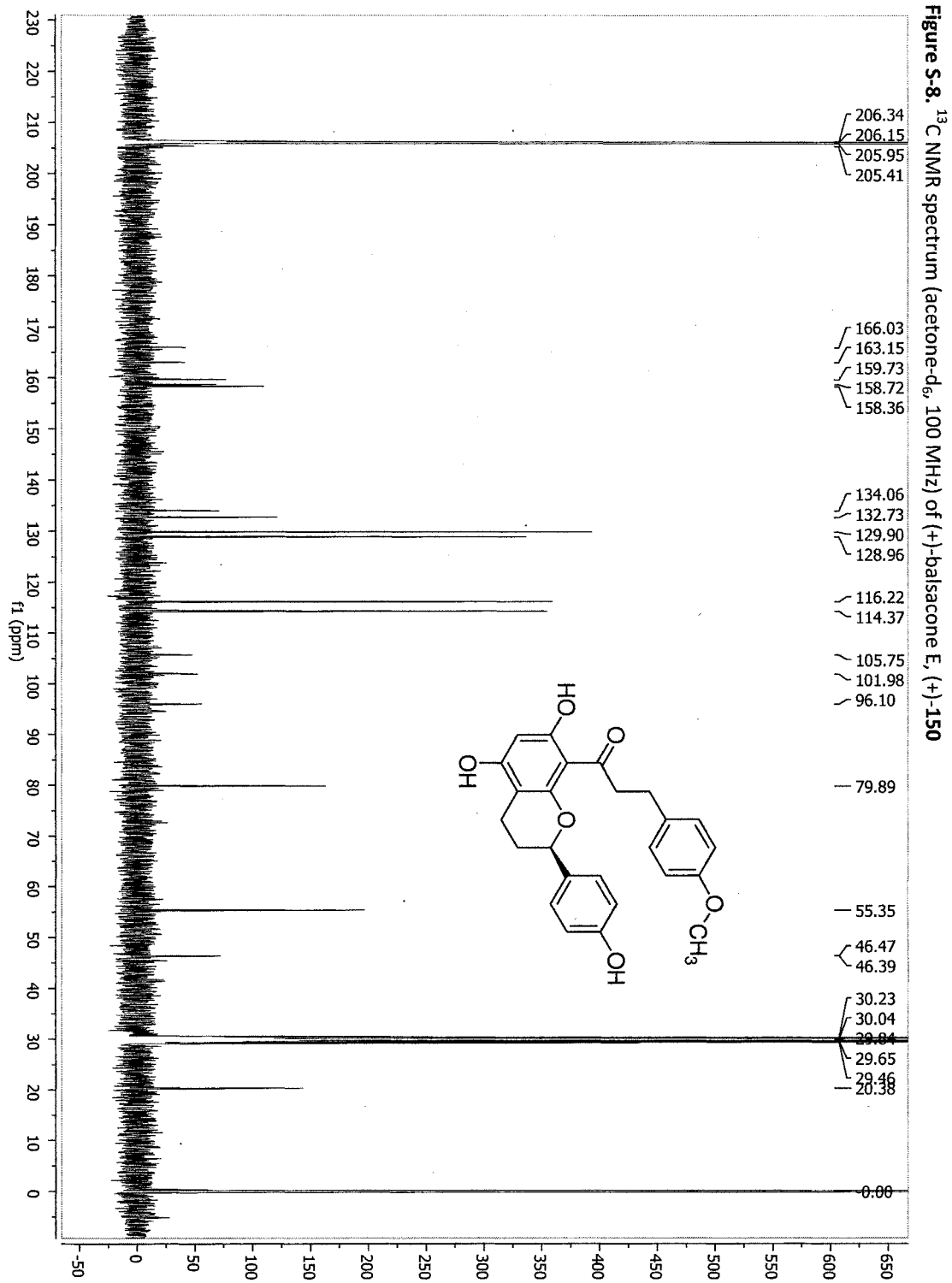
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (+)-balsacone D, (+)-149

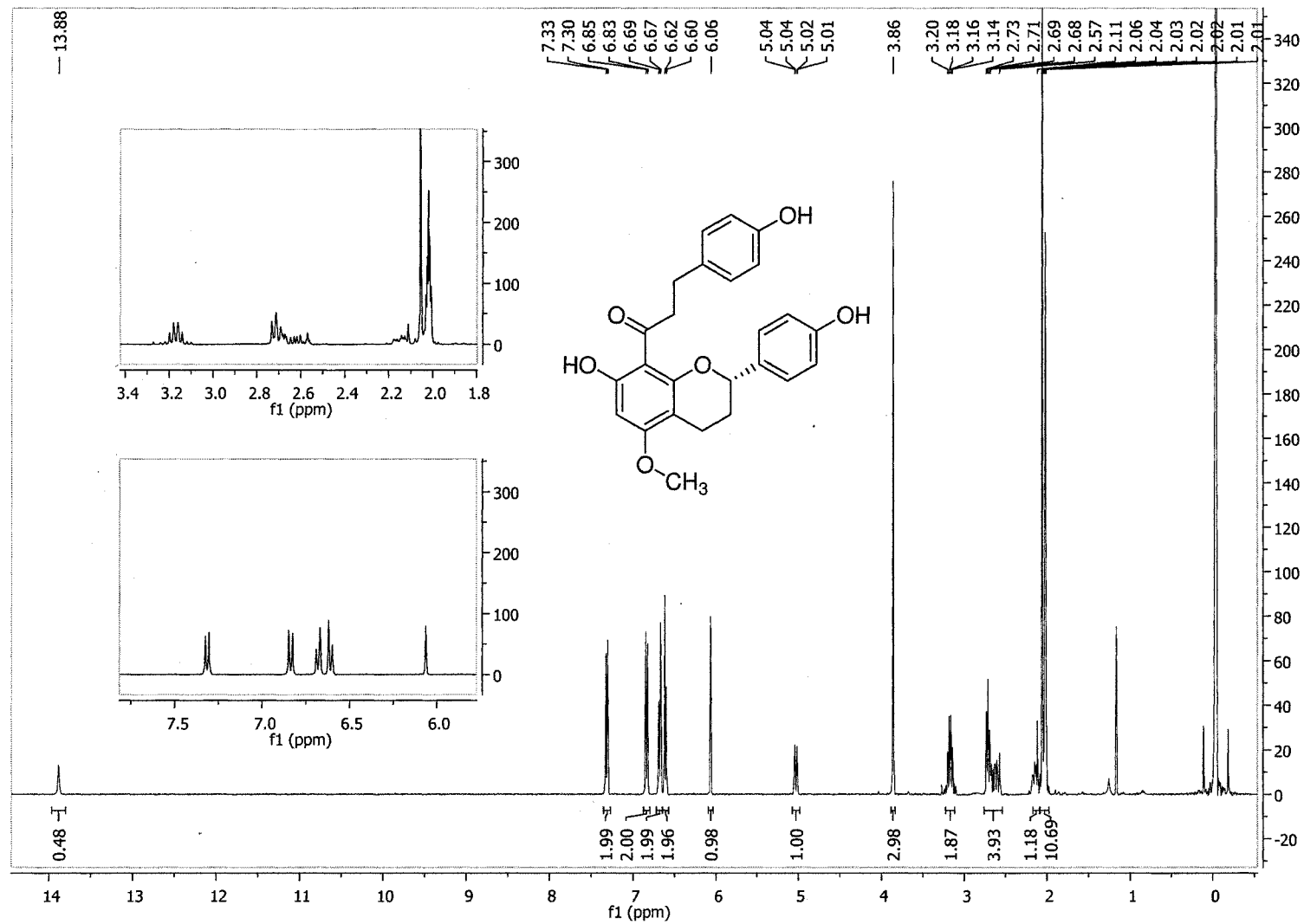


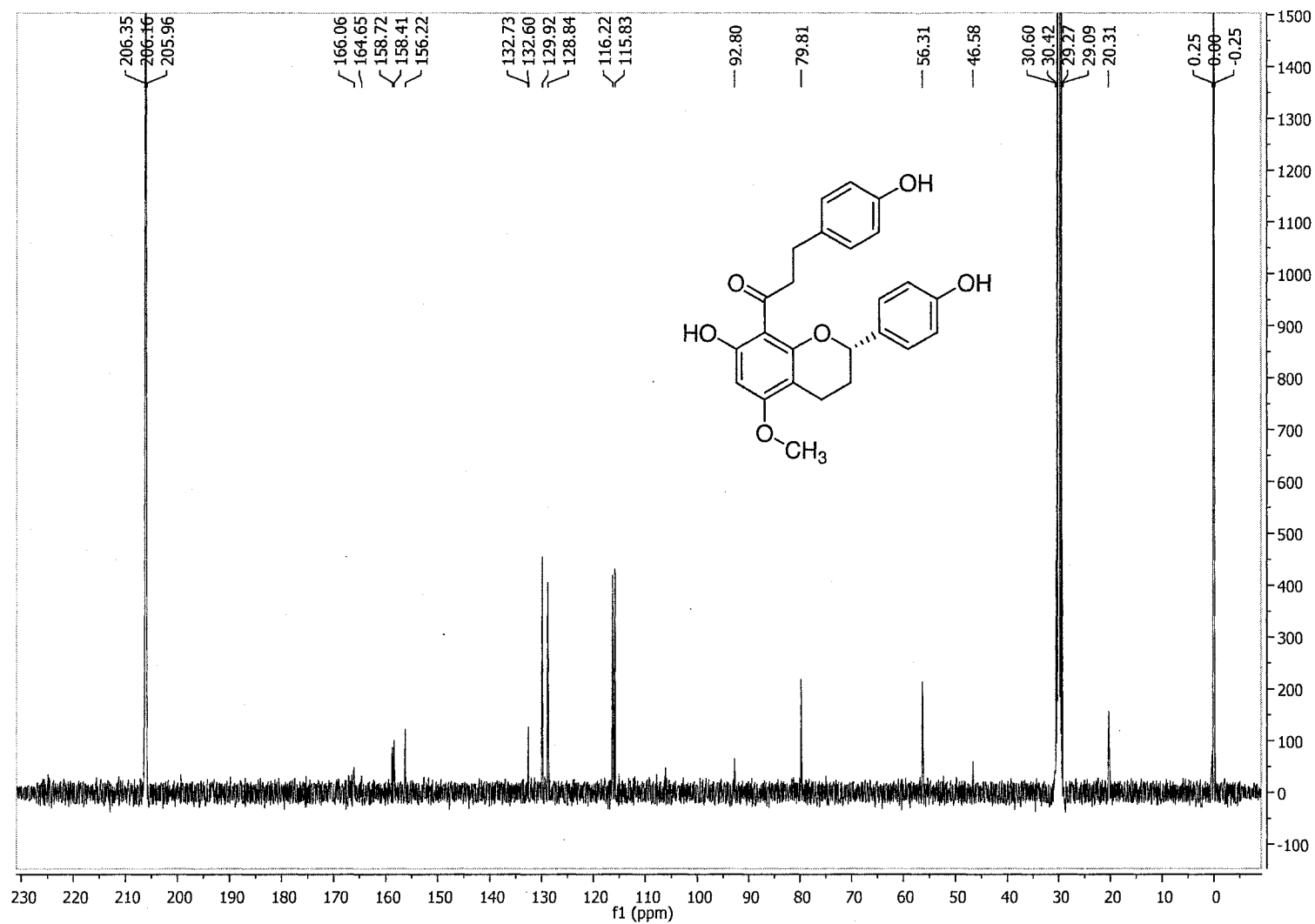
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (-)-balsacone E (-)-150

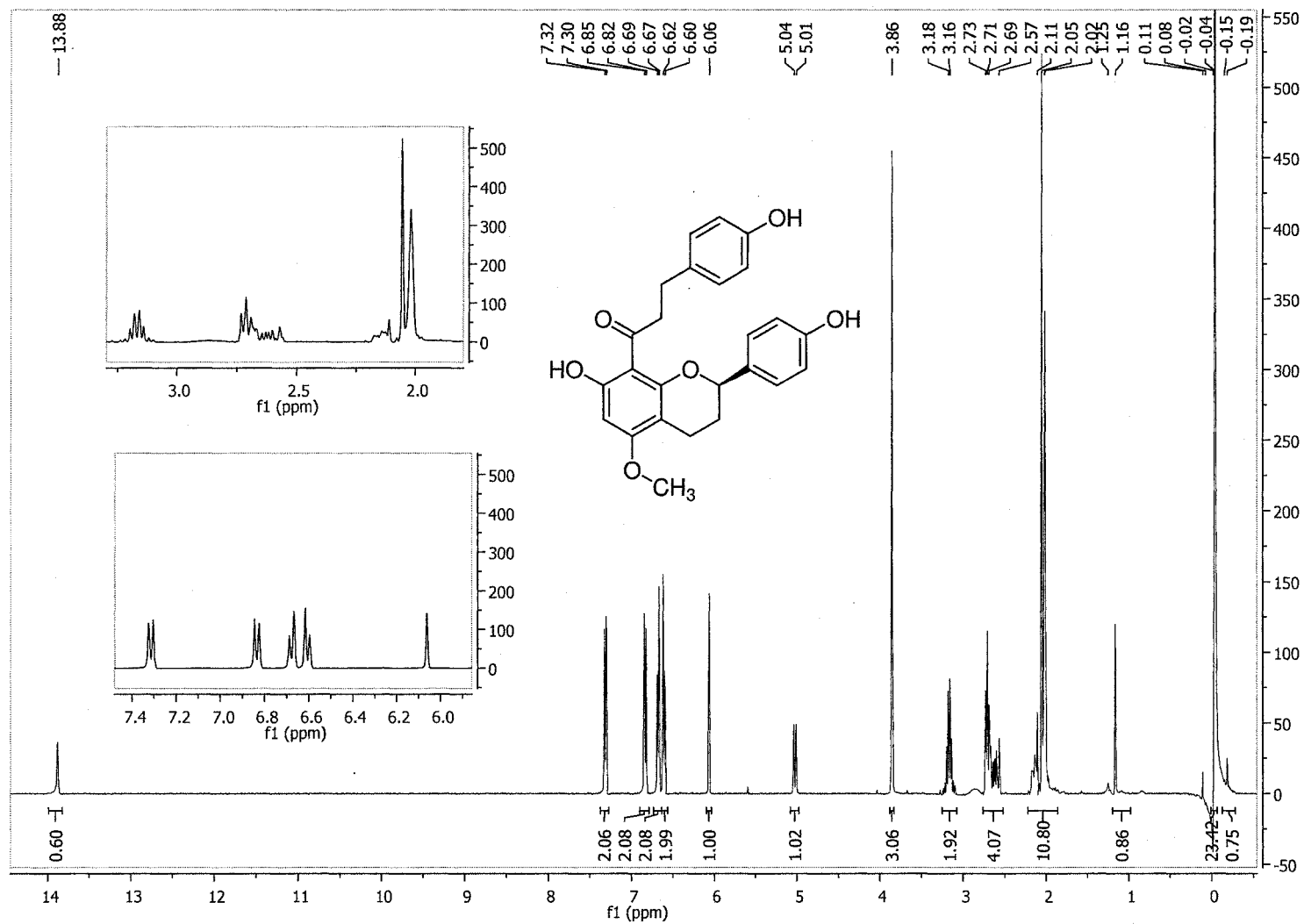


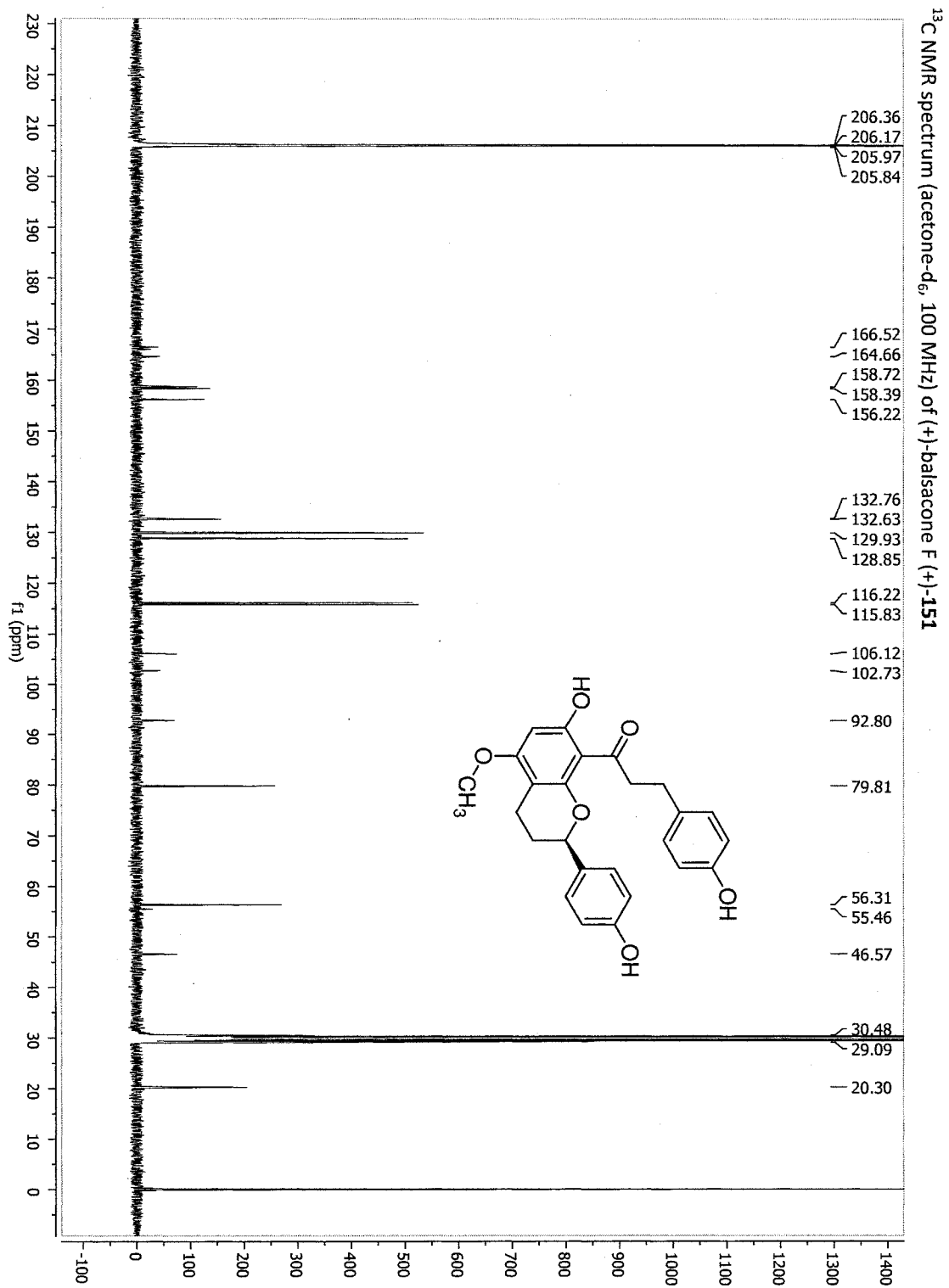
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (+)-balsacone E (+)-150

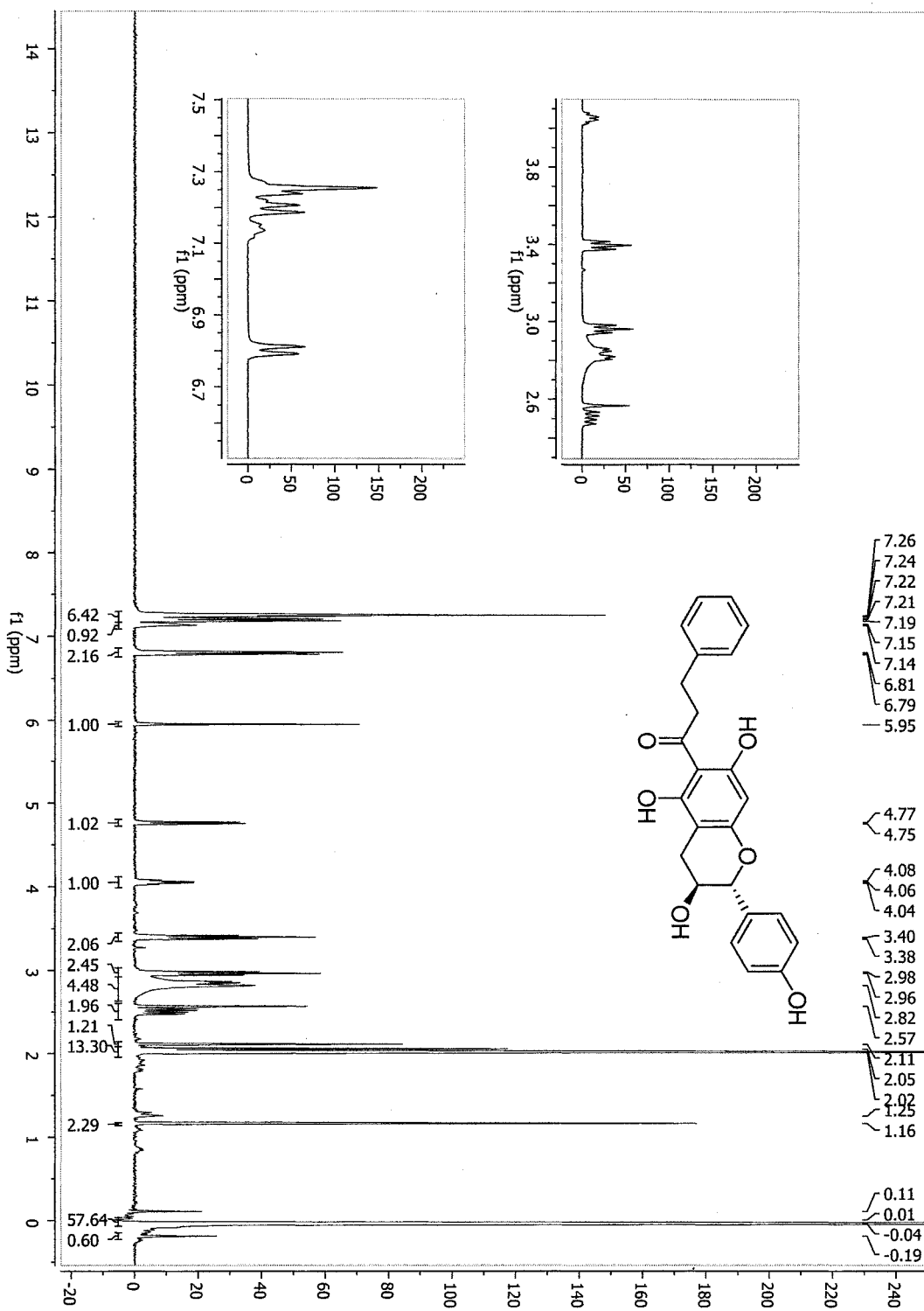


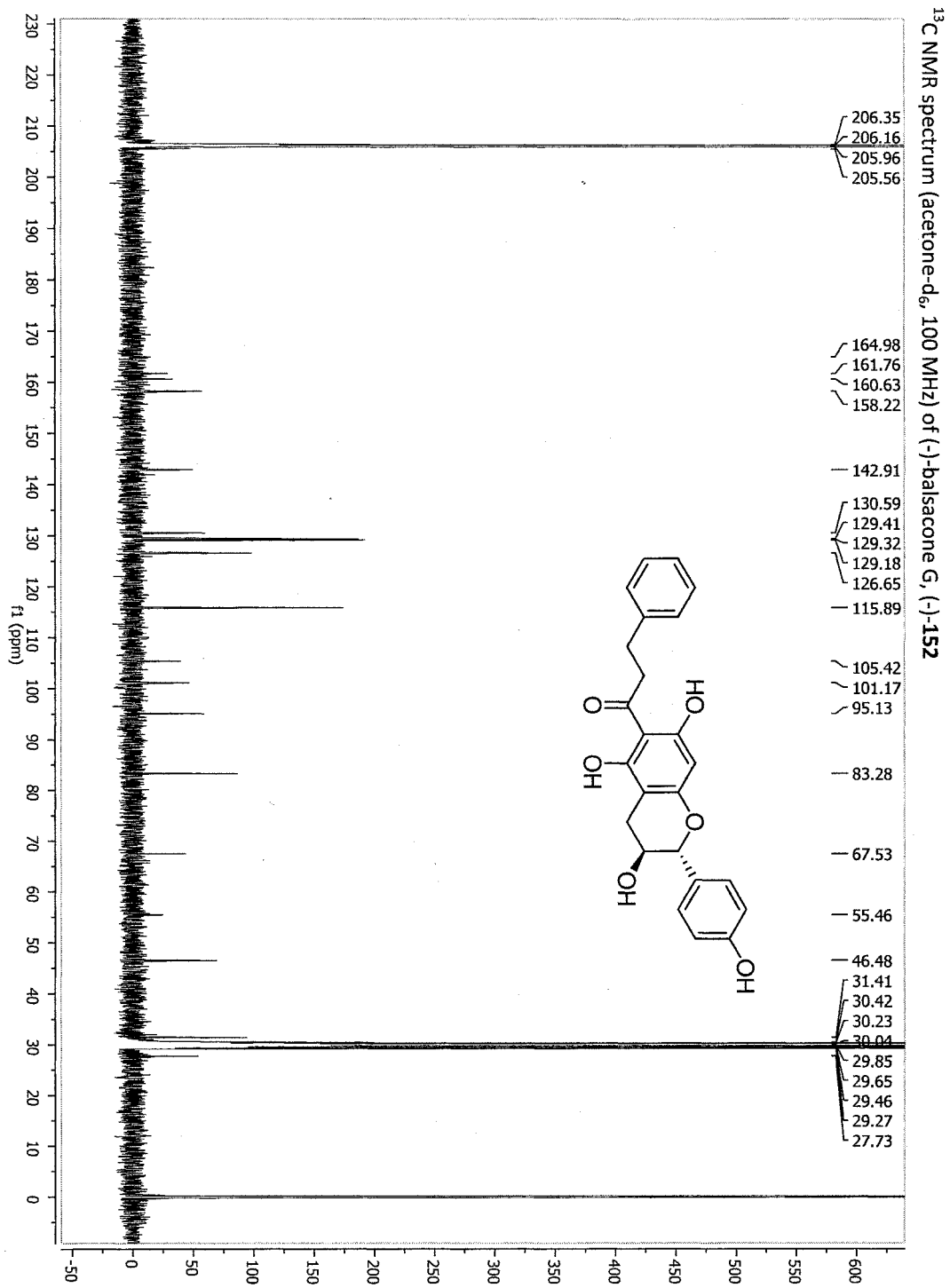
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (-)-balsacone F (-)-151

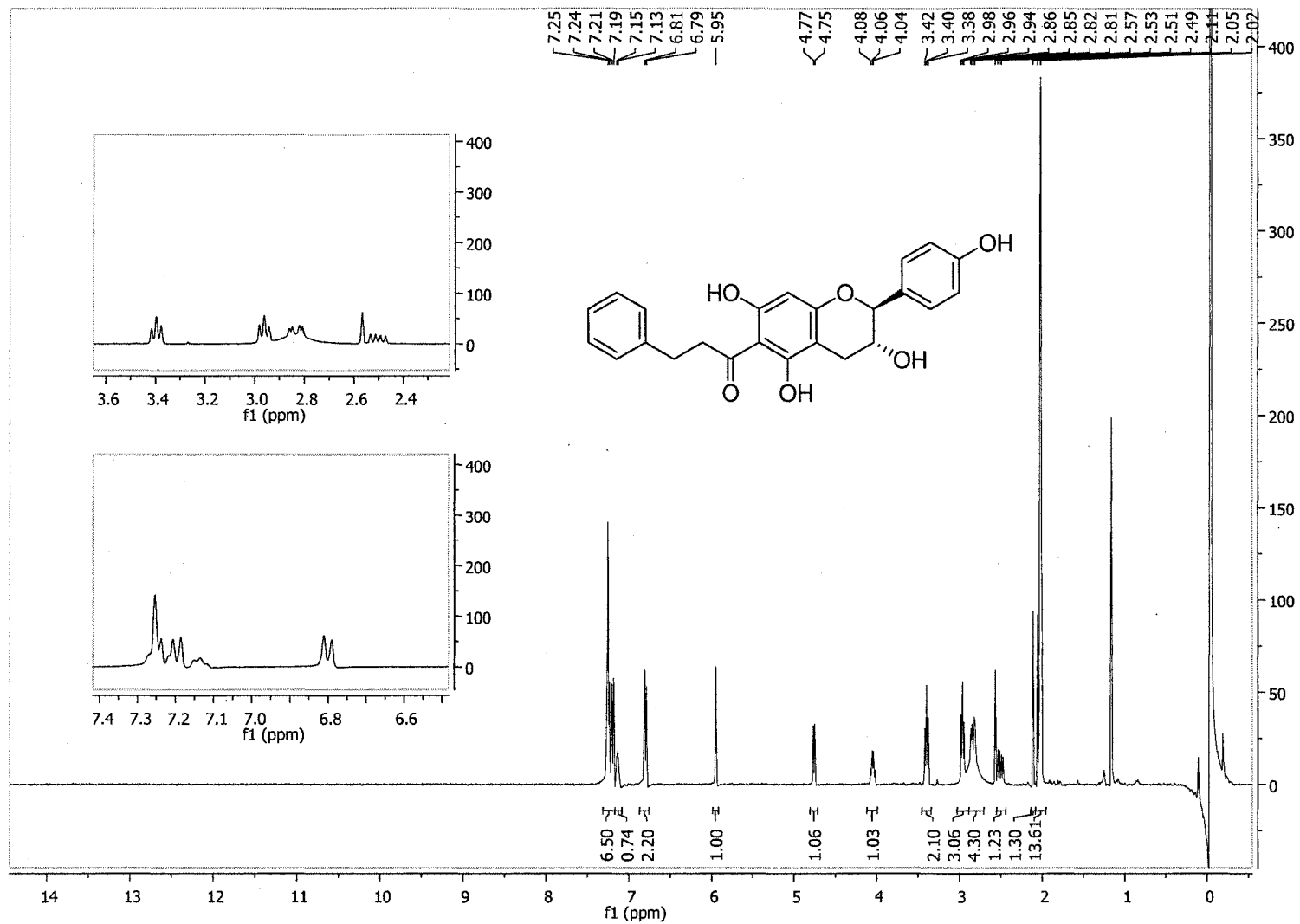
¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (-)-balsacone F, (-)-**151**

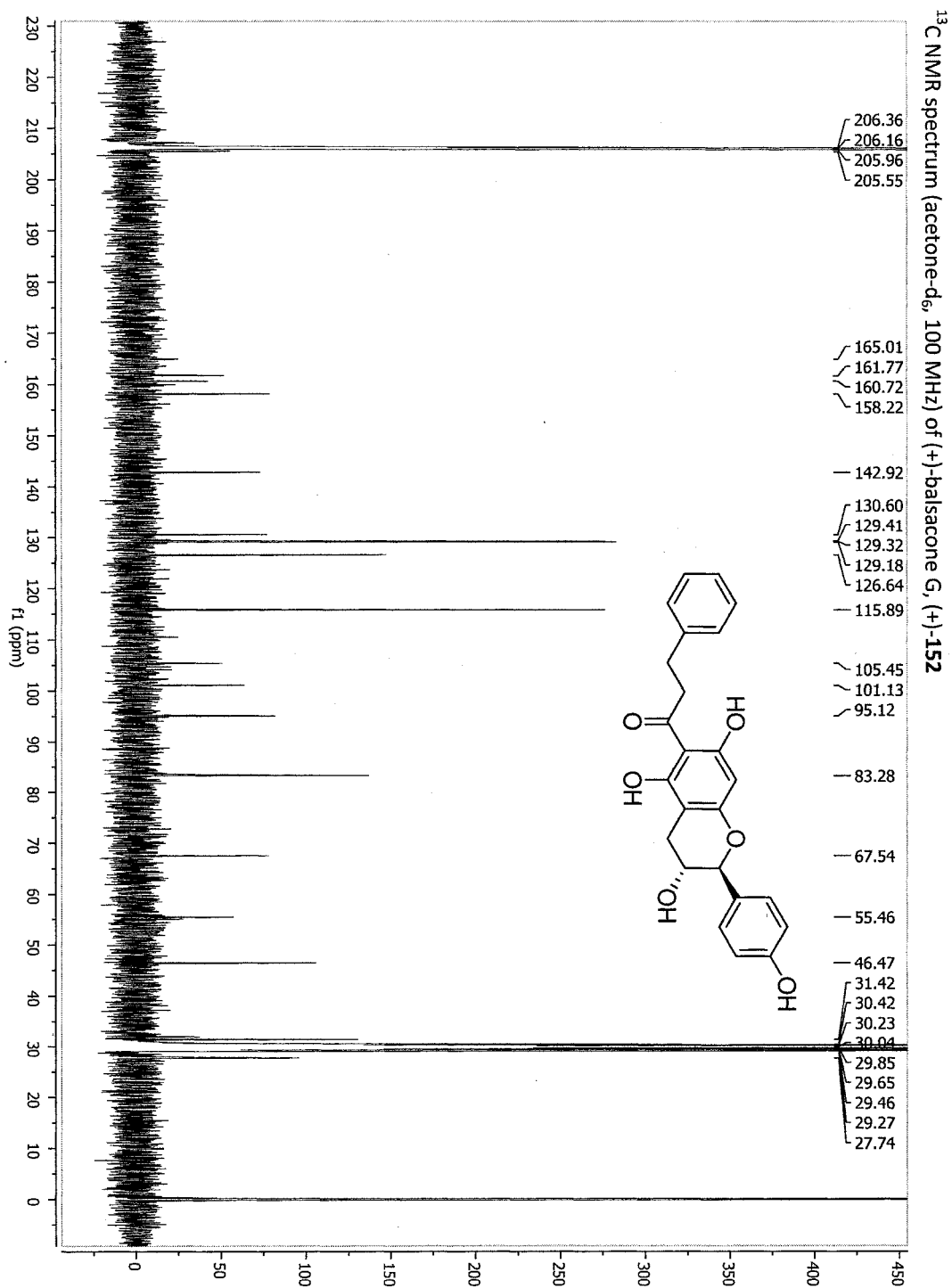
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (+)-balsacone F (+)-151

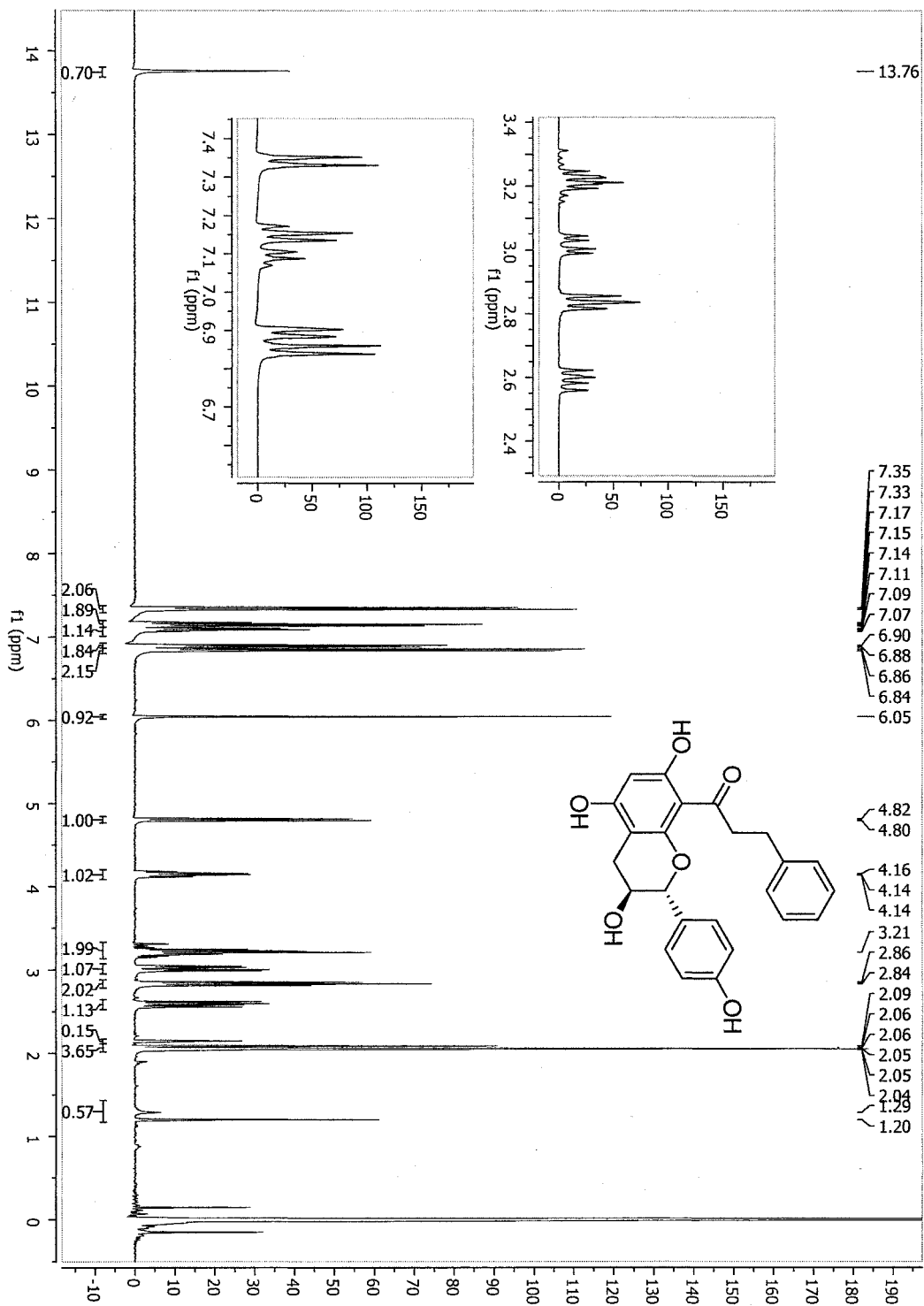


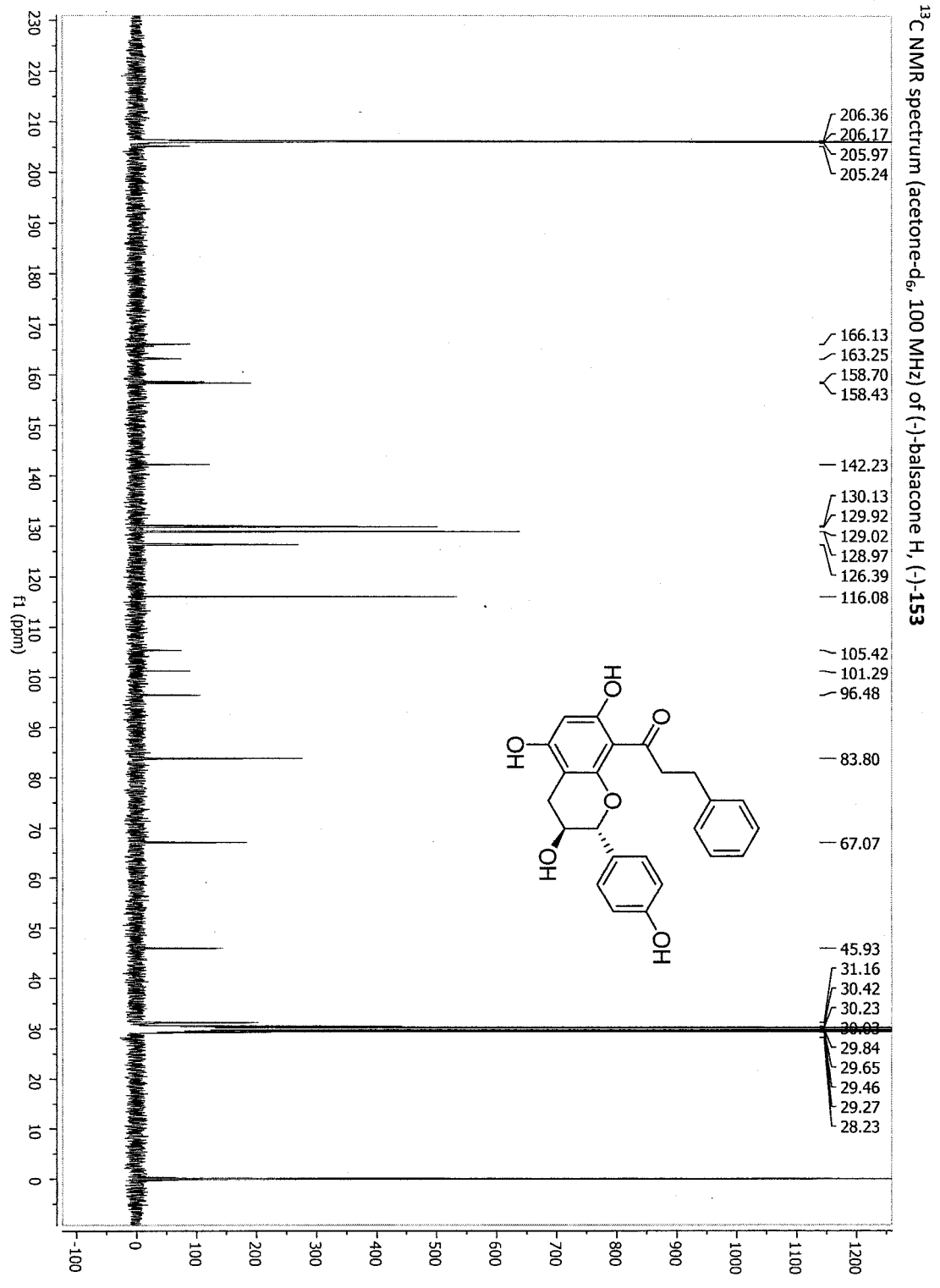
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (-)-balsacone G, (-)-152

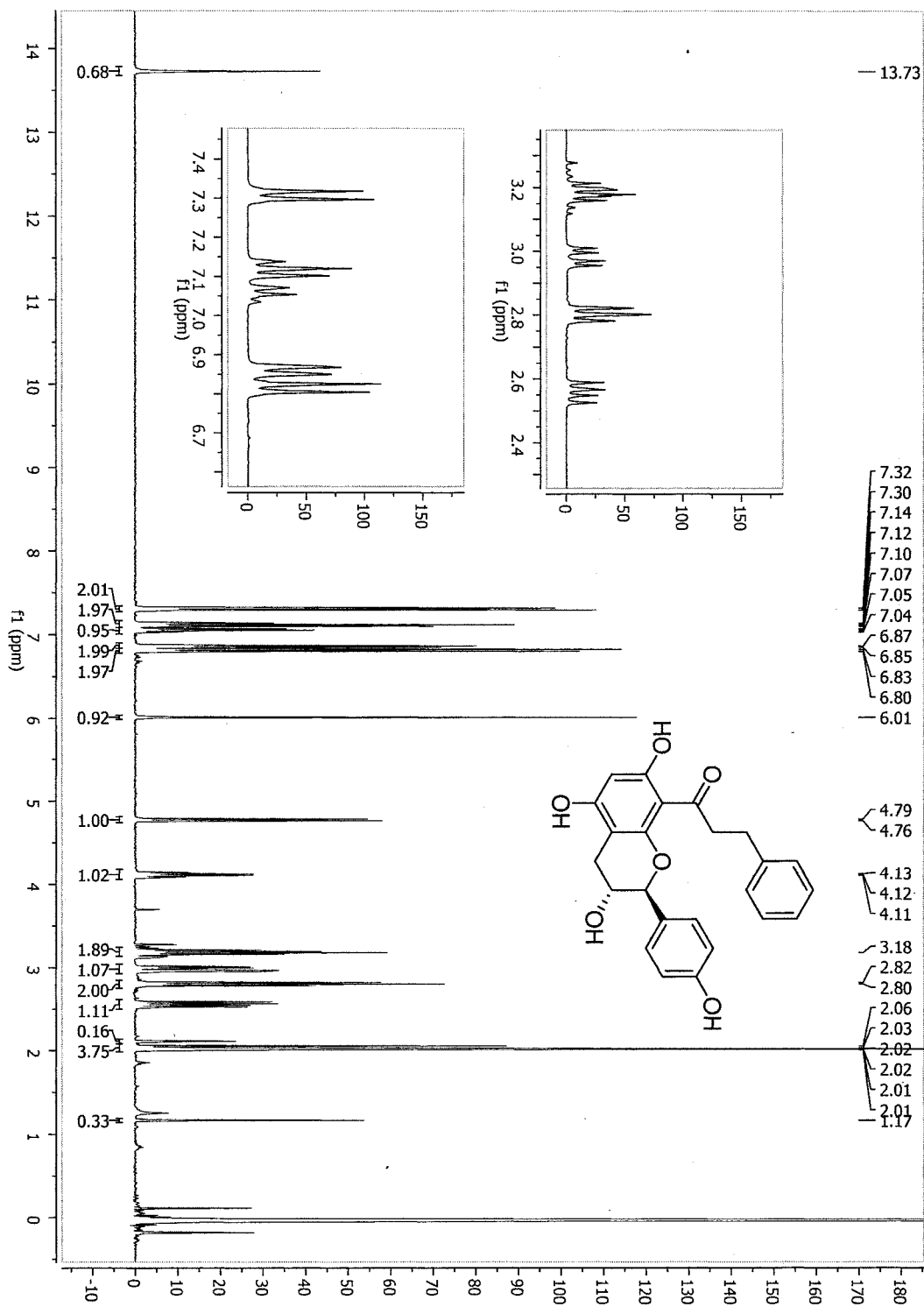


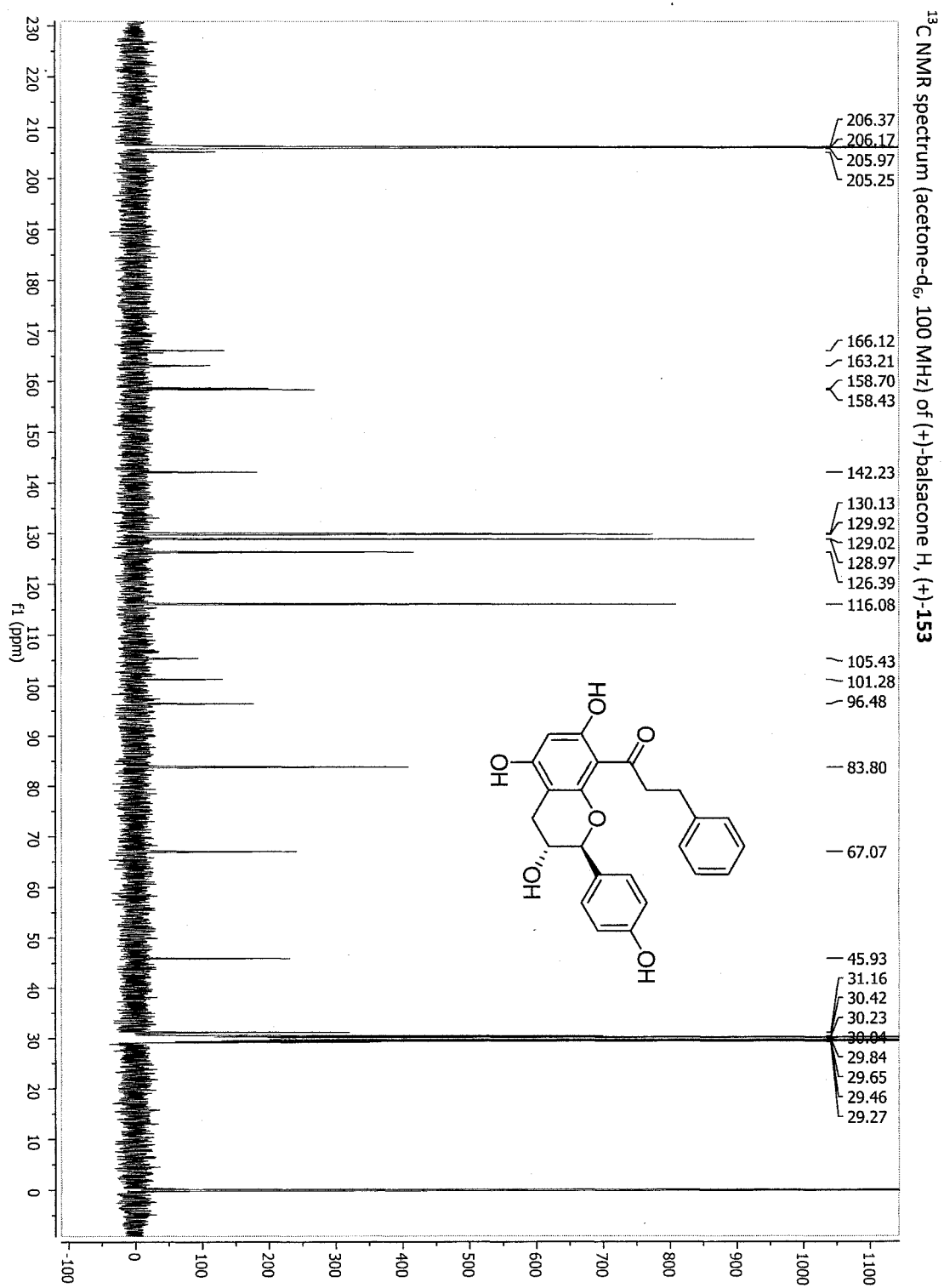
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (+)-balsacone G, (+)-152



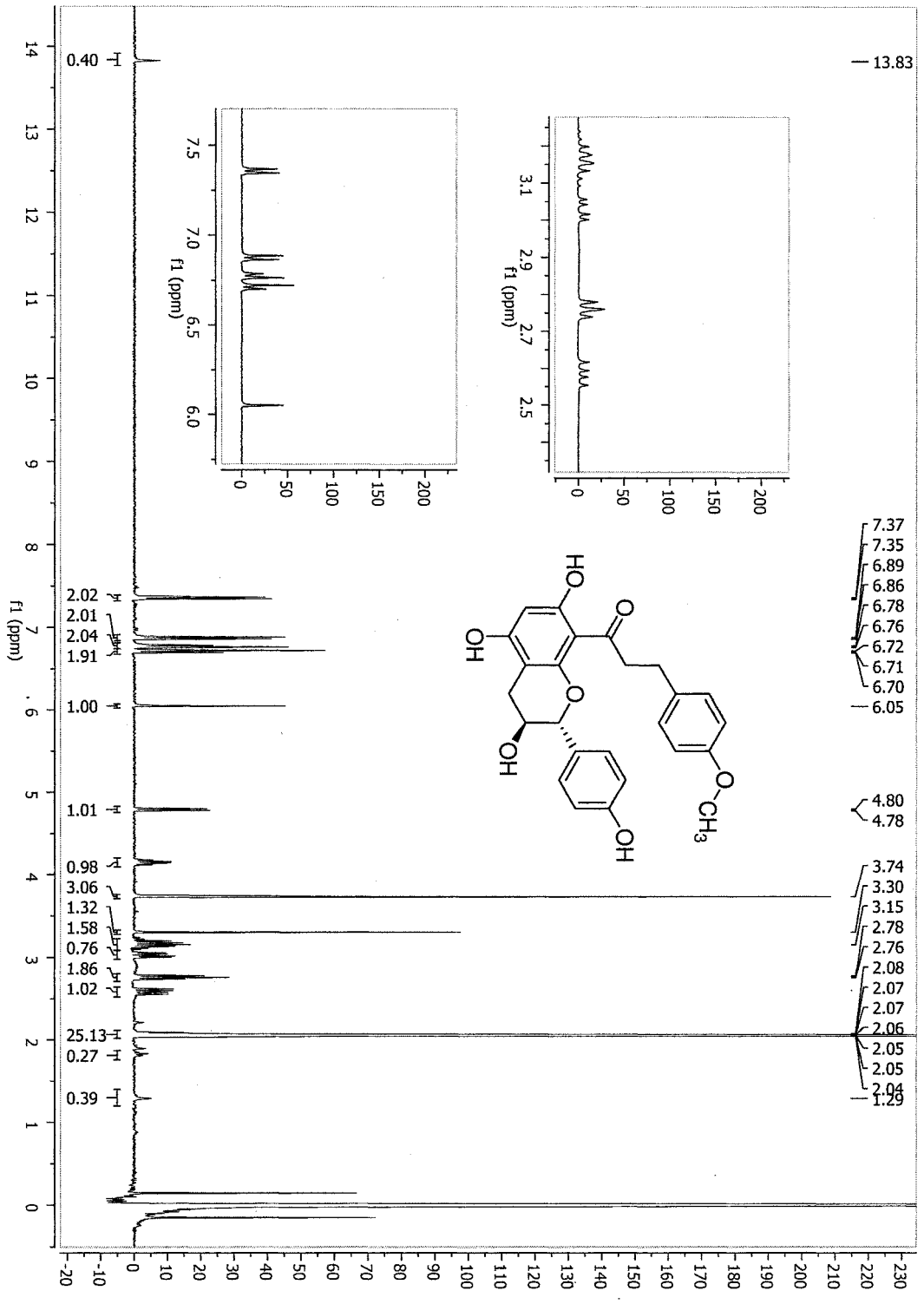
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (-)-balsacone H, (-)-153



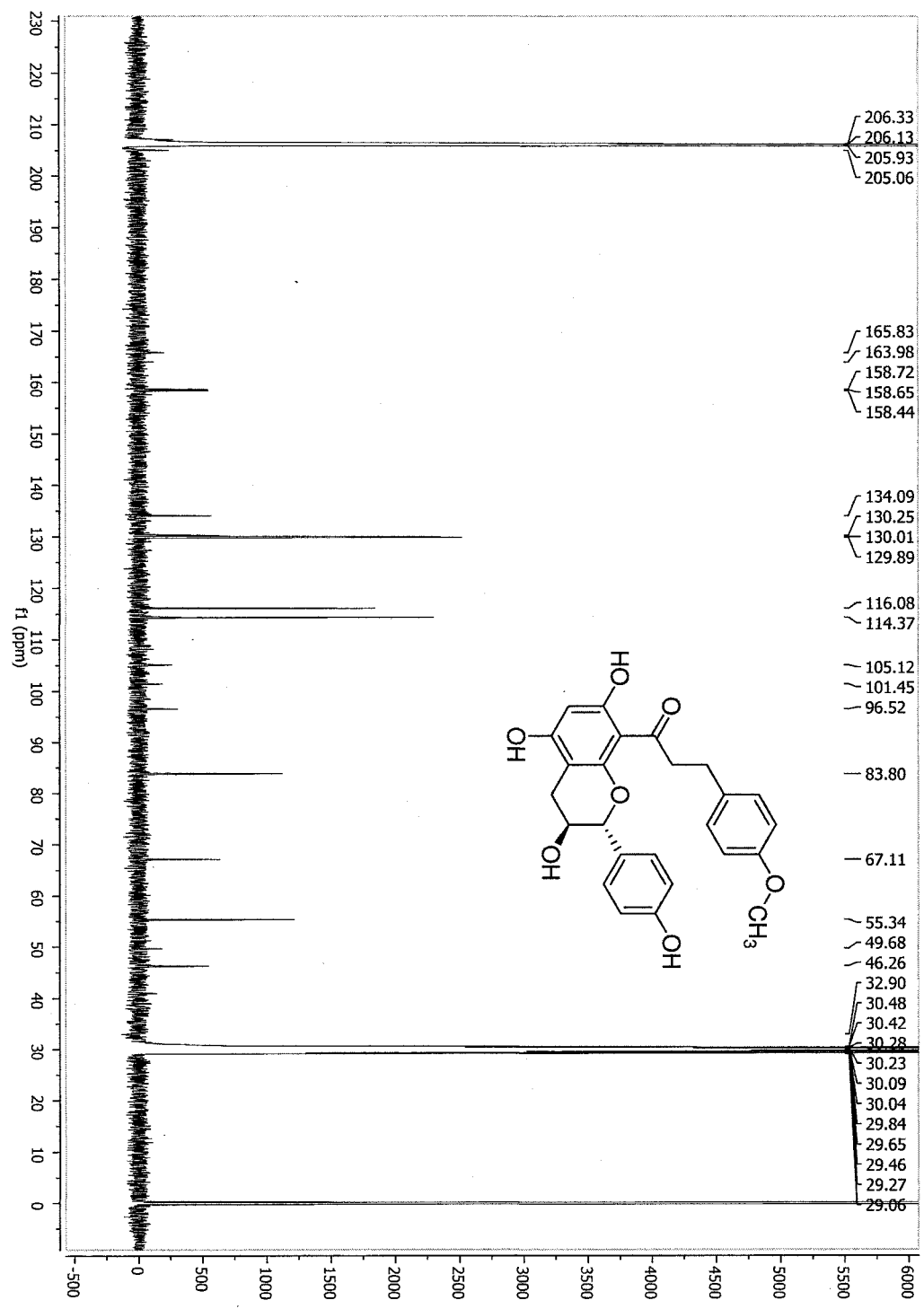
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (+)-balsacone H, (+)-153

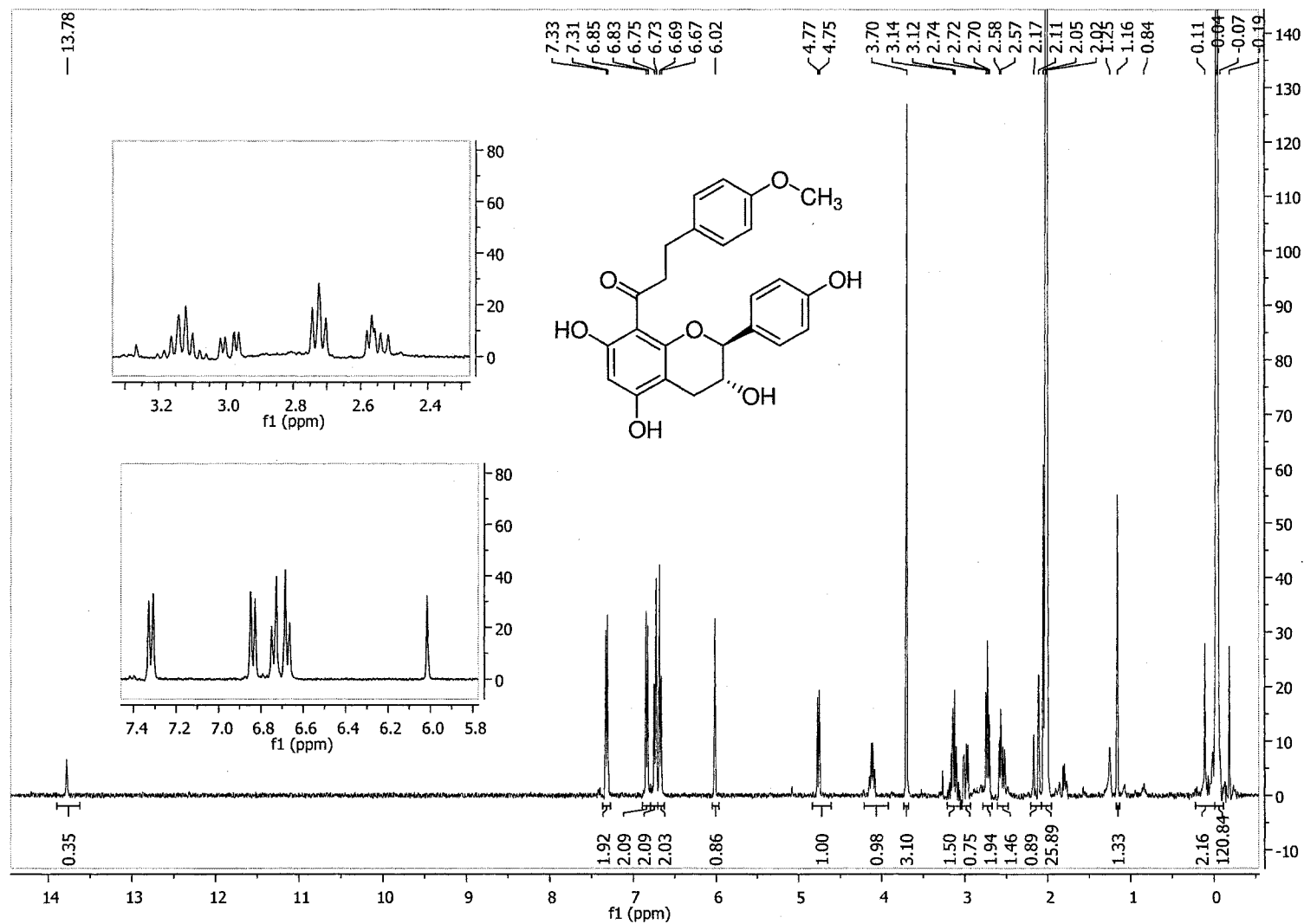


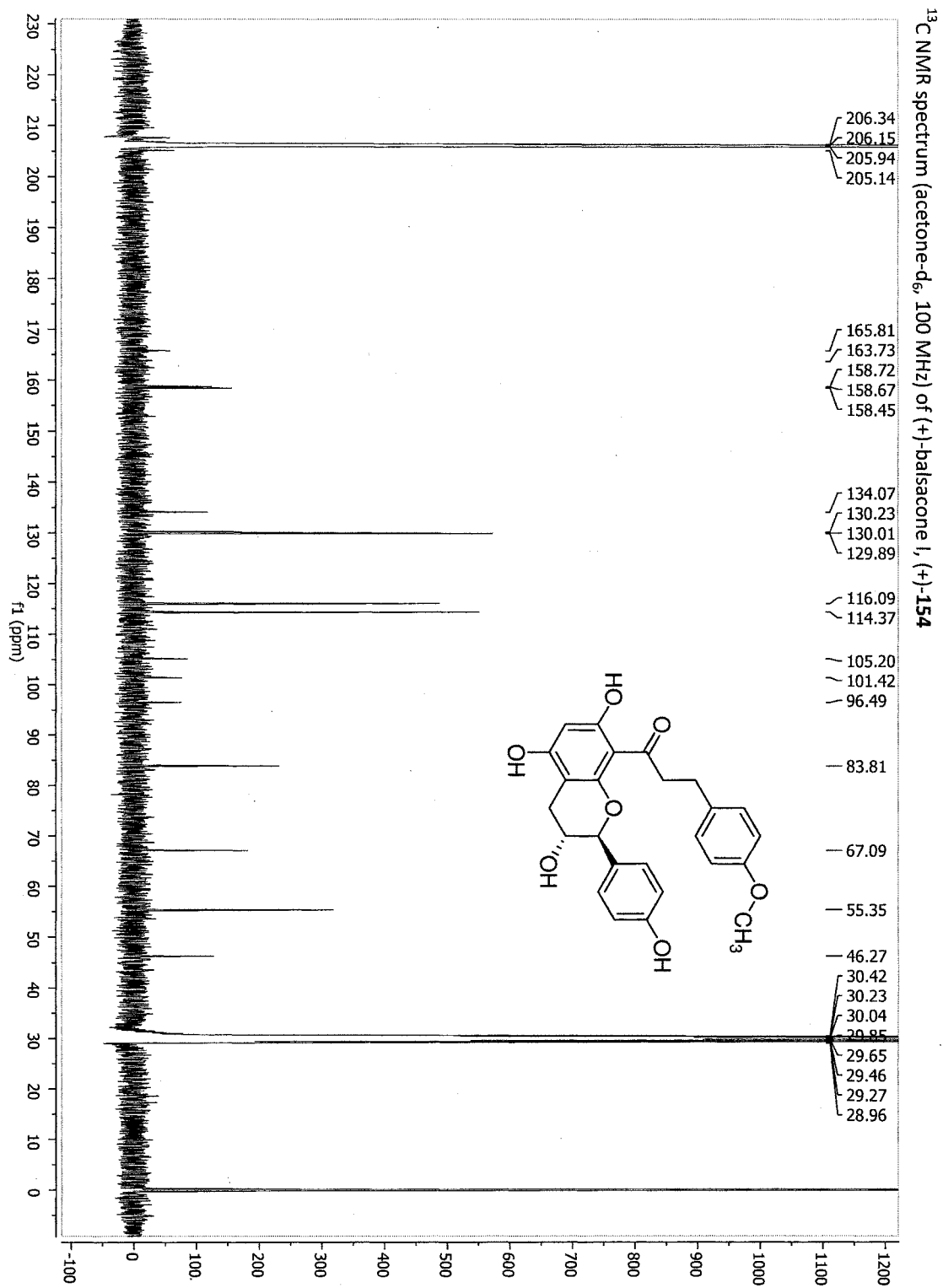
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (-)-balsacone 1, (-)-154

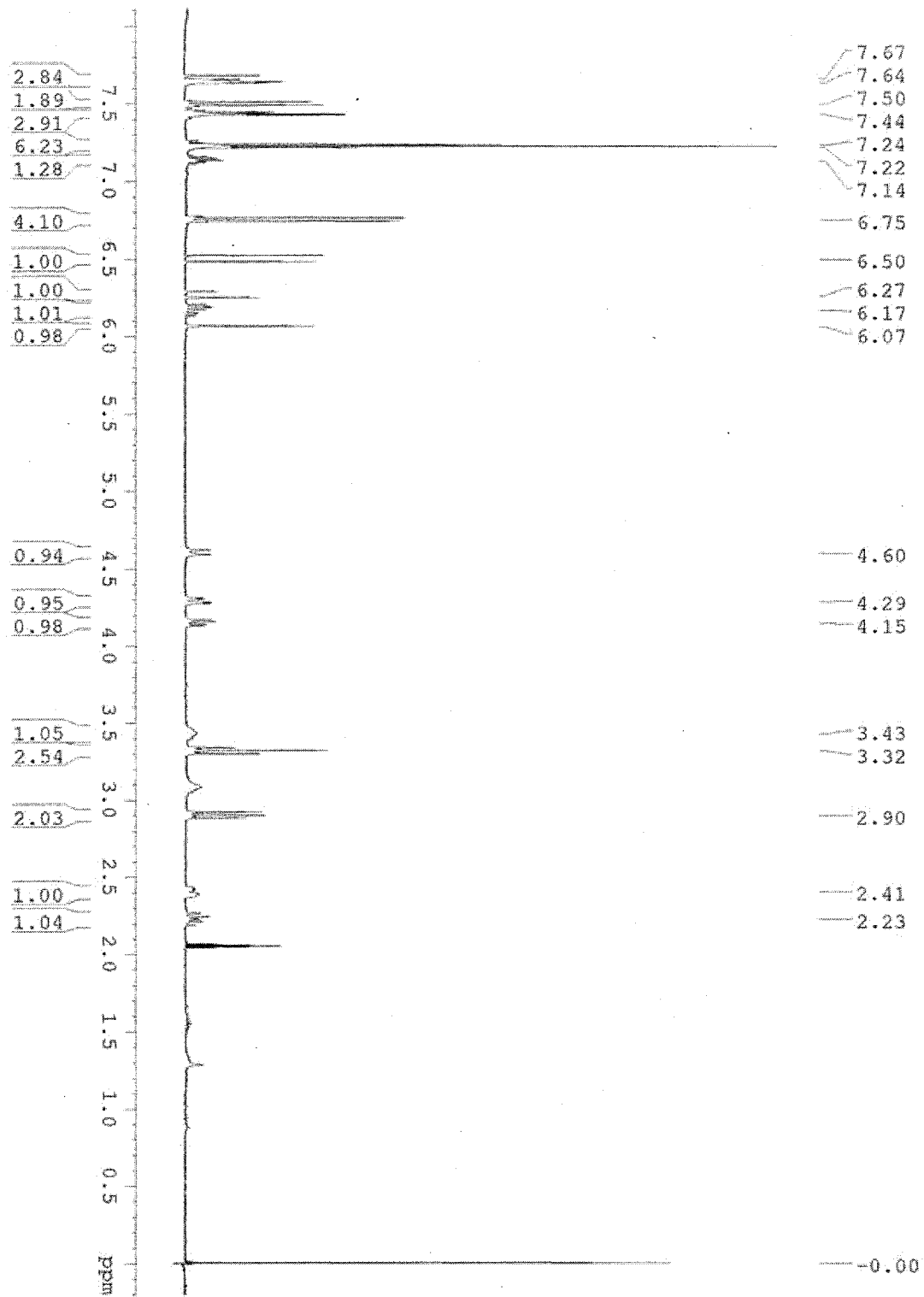


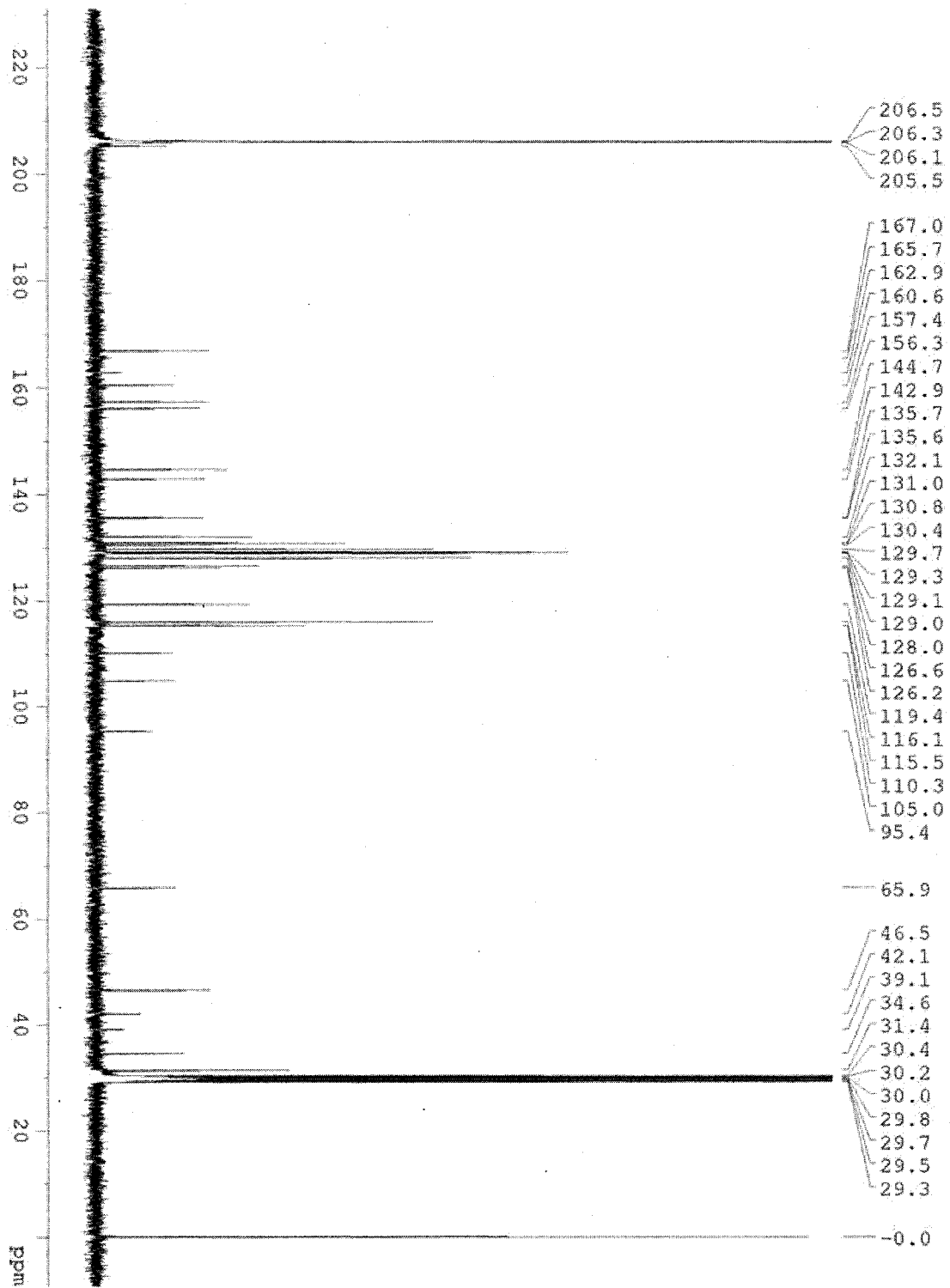
¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (-)-balsacone I, (-)-154

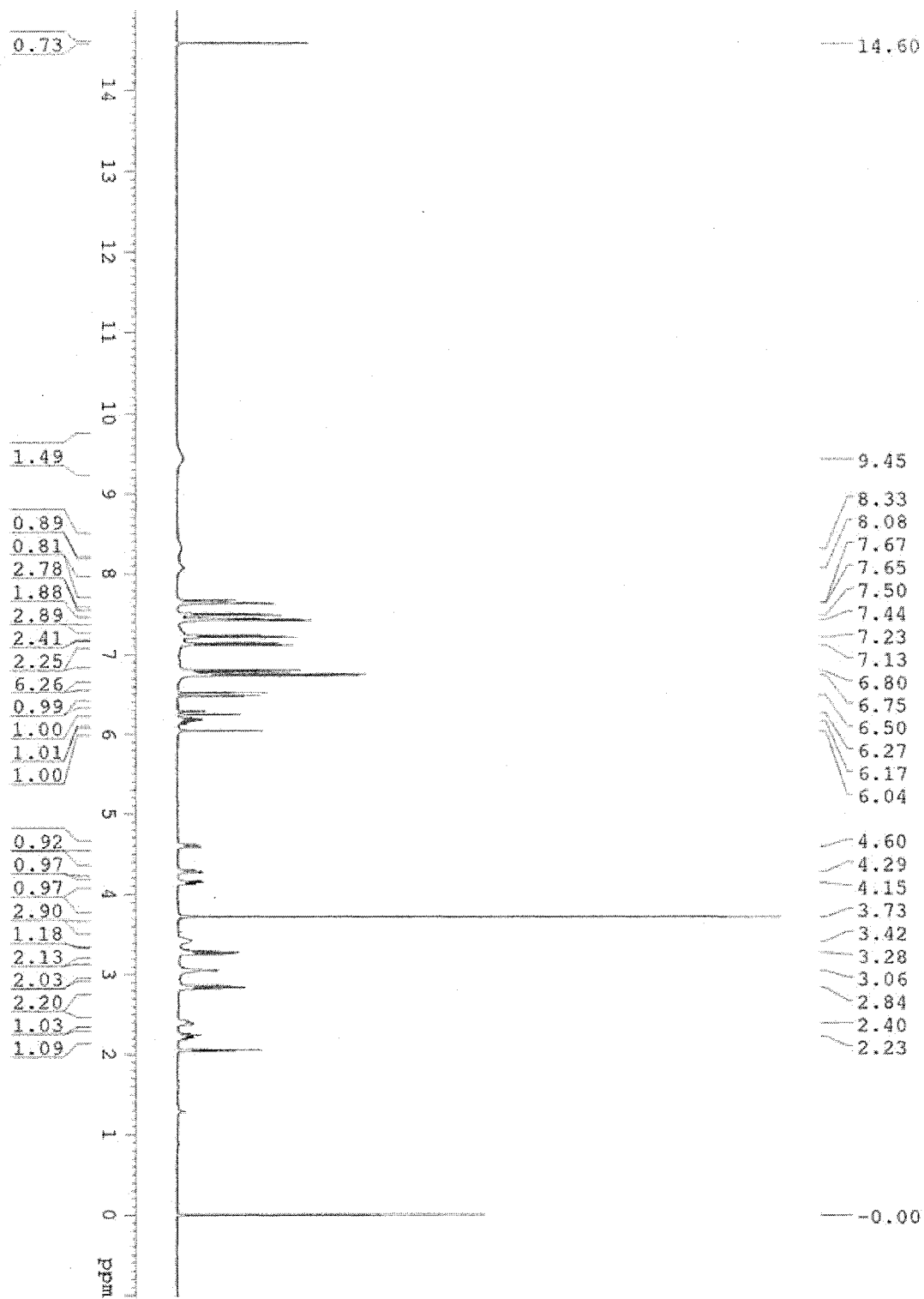


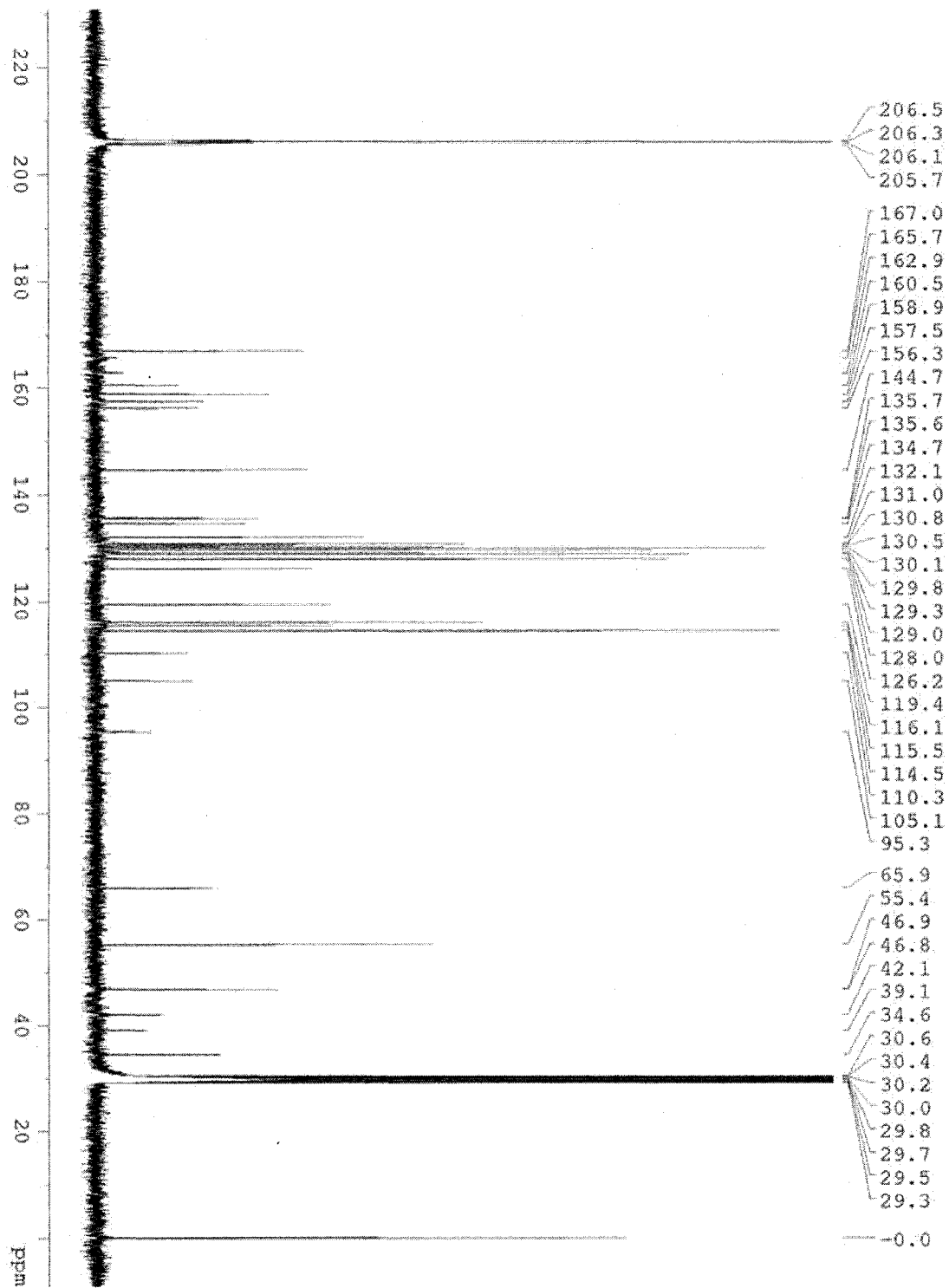
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (+)-balsacone I, (+)-154

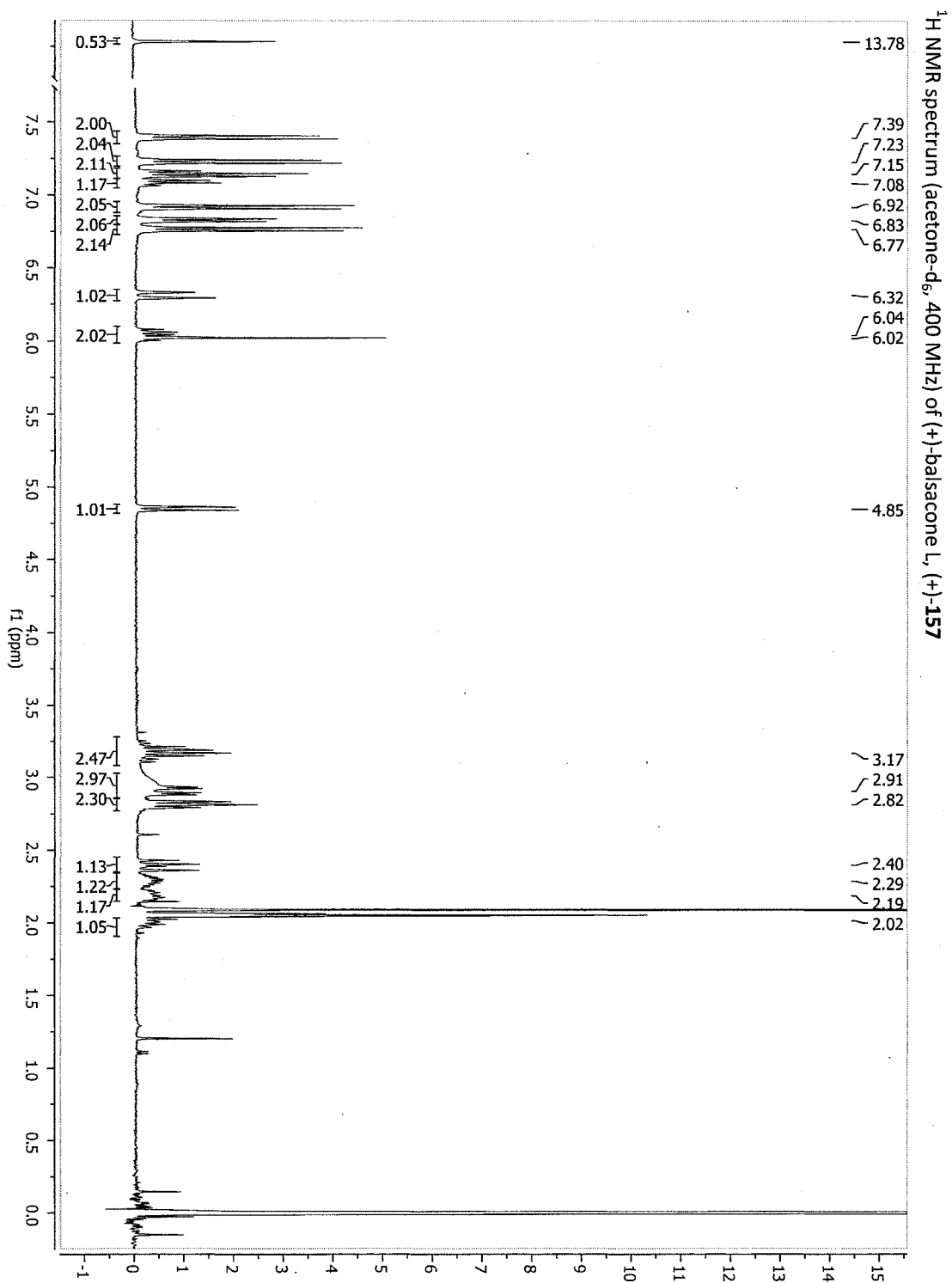


^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (\pm)-balsacone J, (\pm)-155

^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (\pm)-balsacone J, (\pm)-155

^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (\pm)-balsacone k, (\pm)-156

^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (\pm)-balsacone K ((\pm)-156)



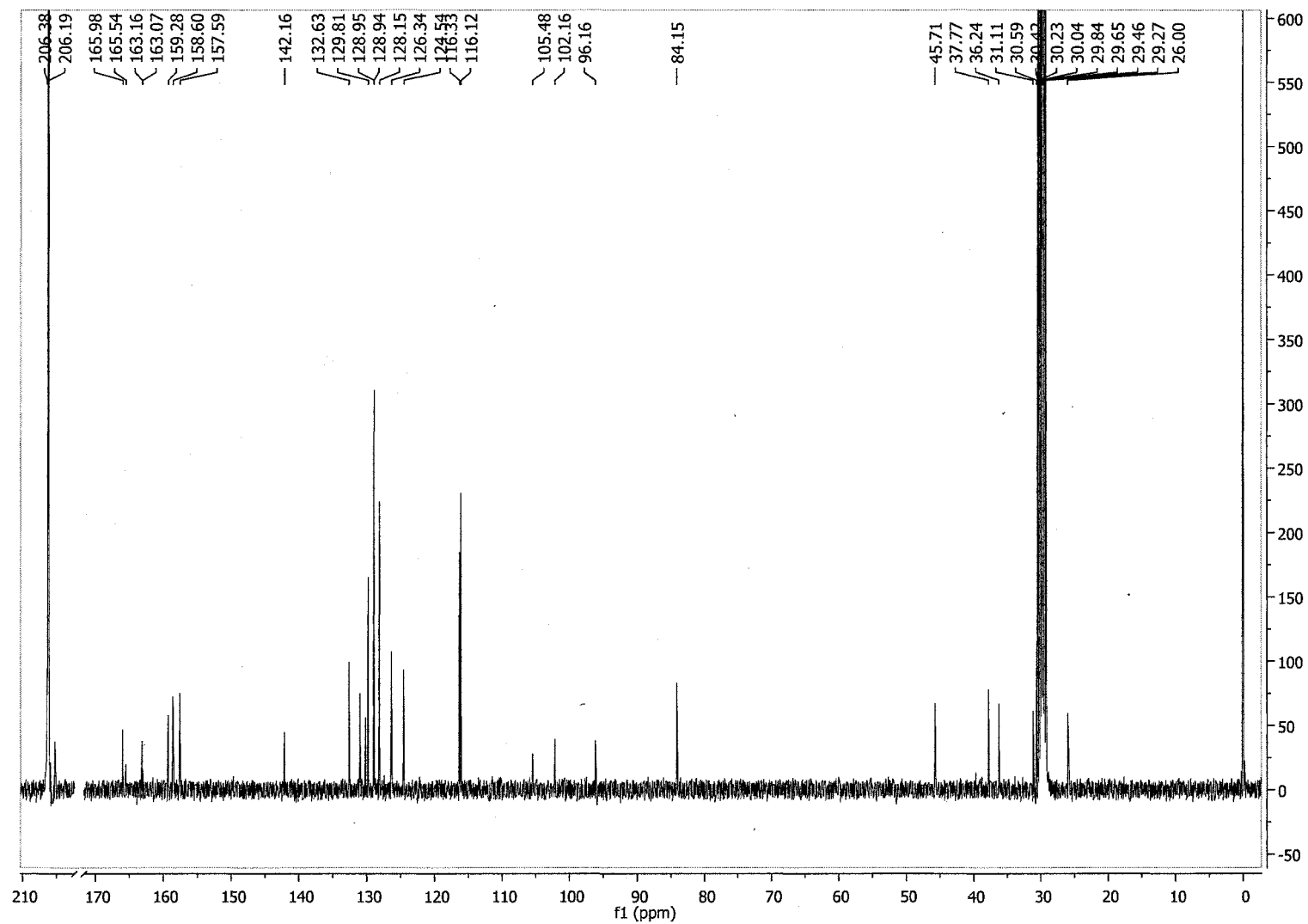
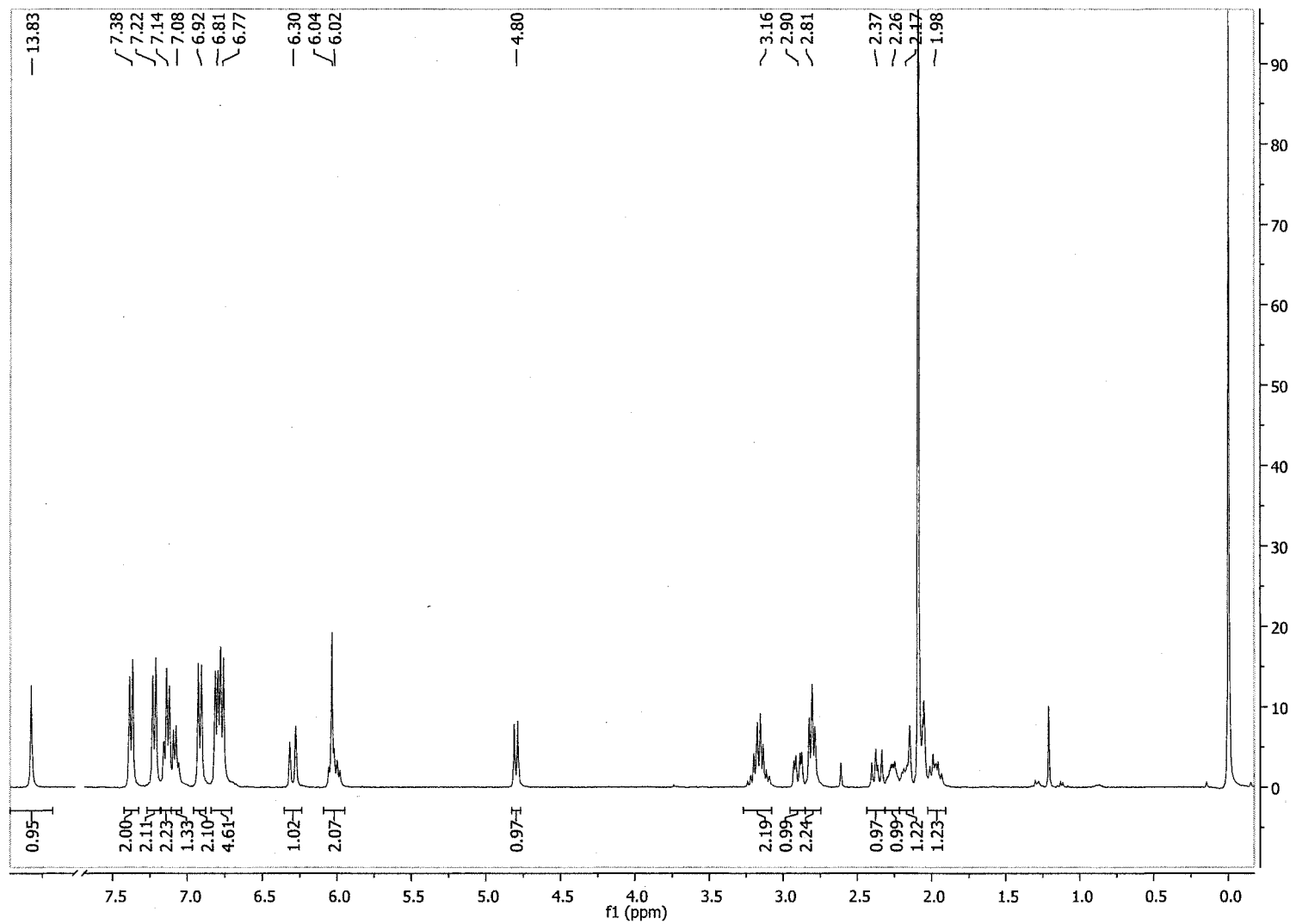
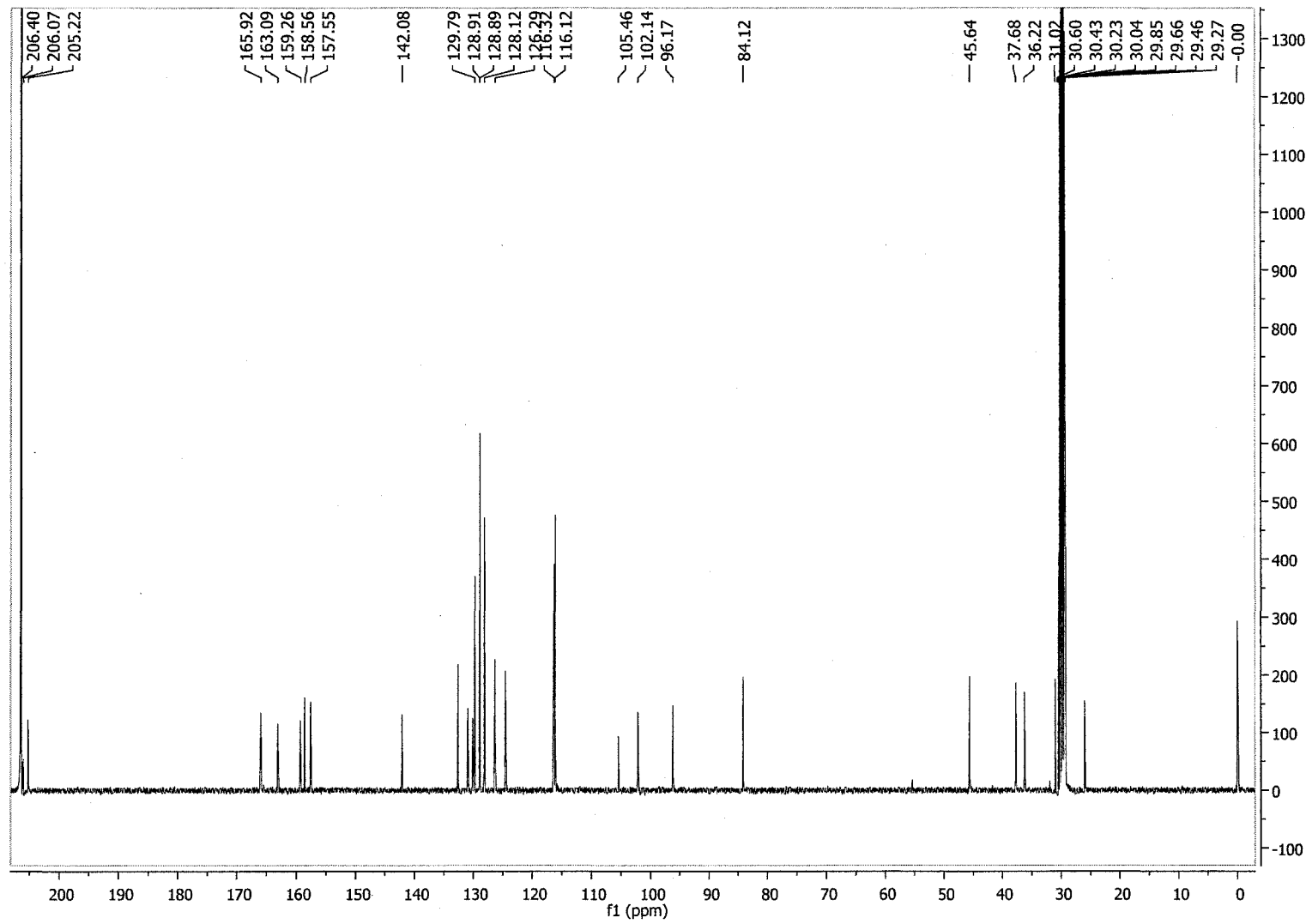
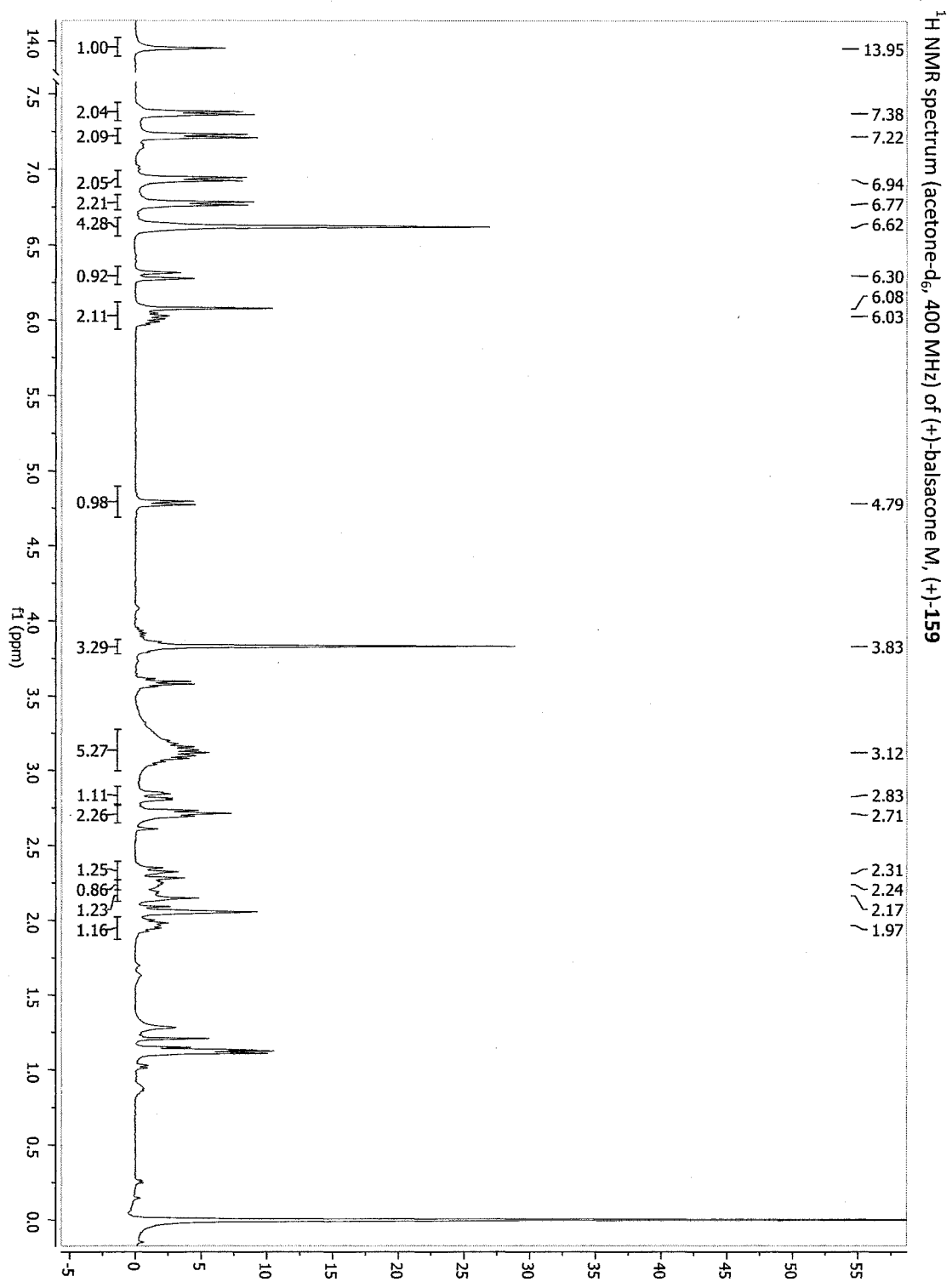
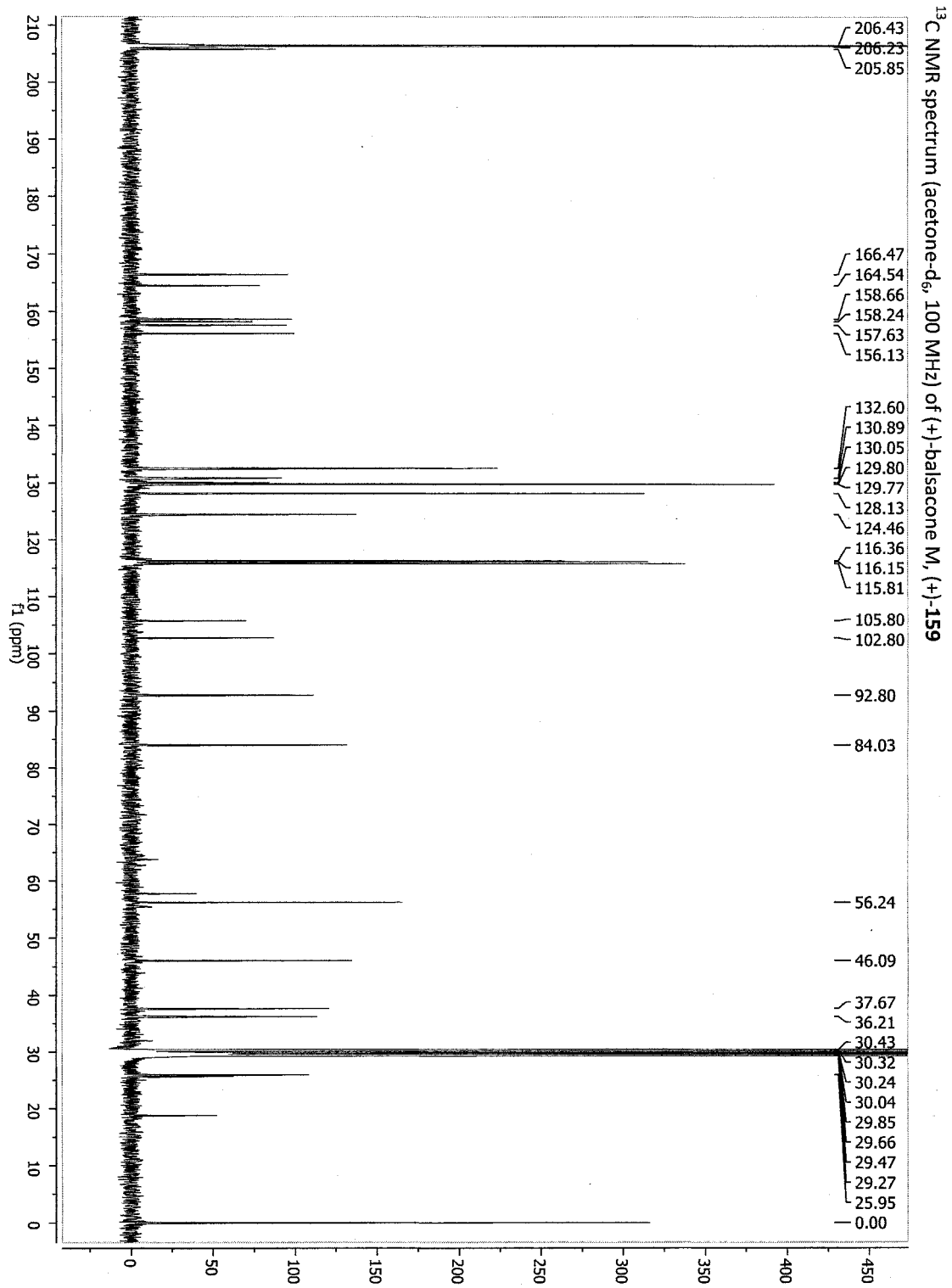
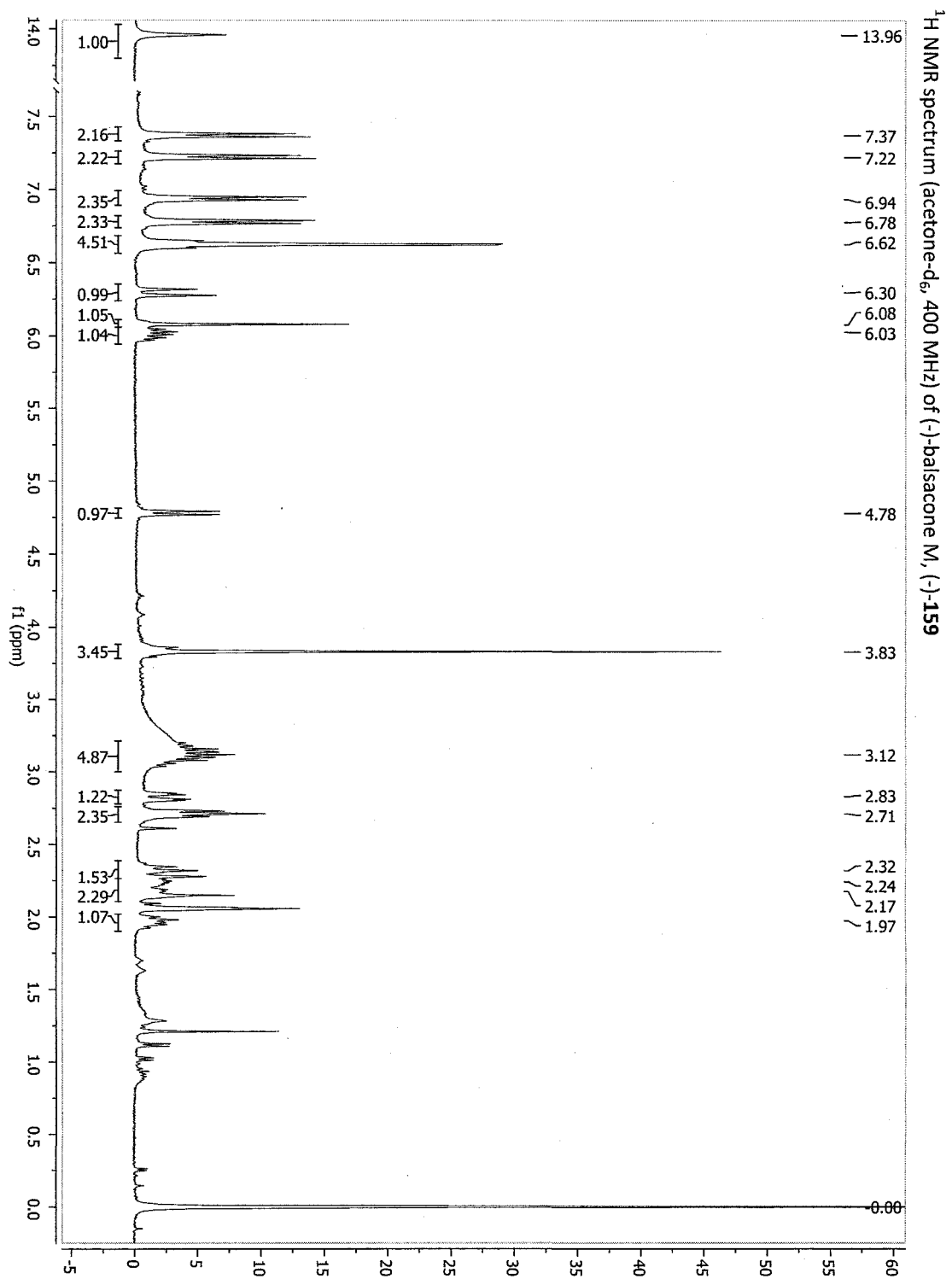
^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (+)-balsacone L, (+)-157

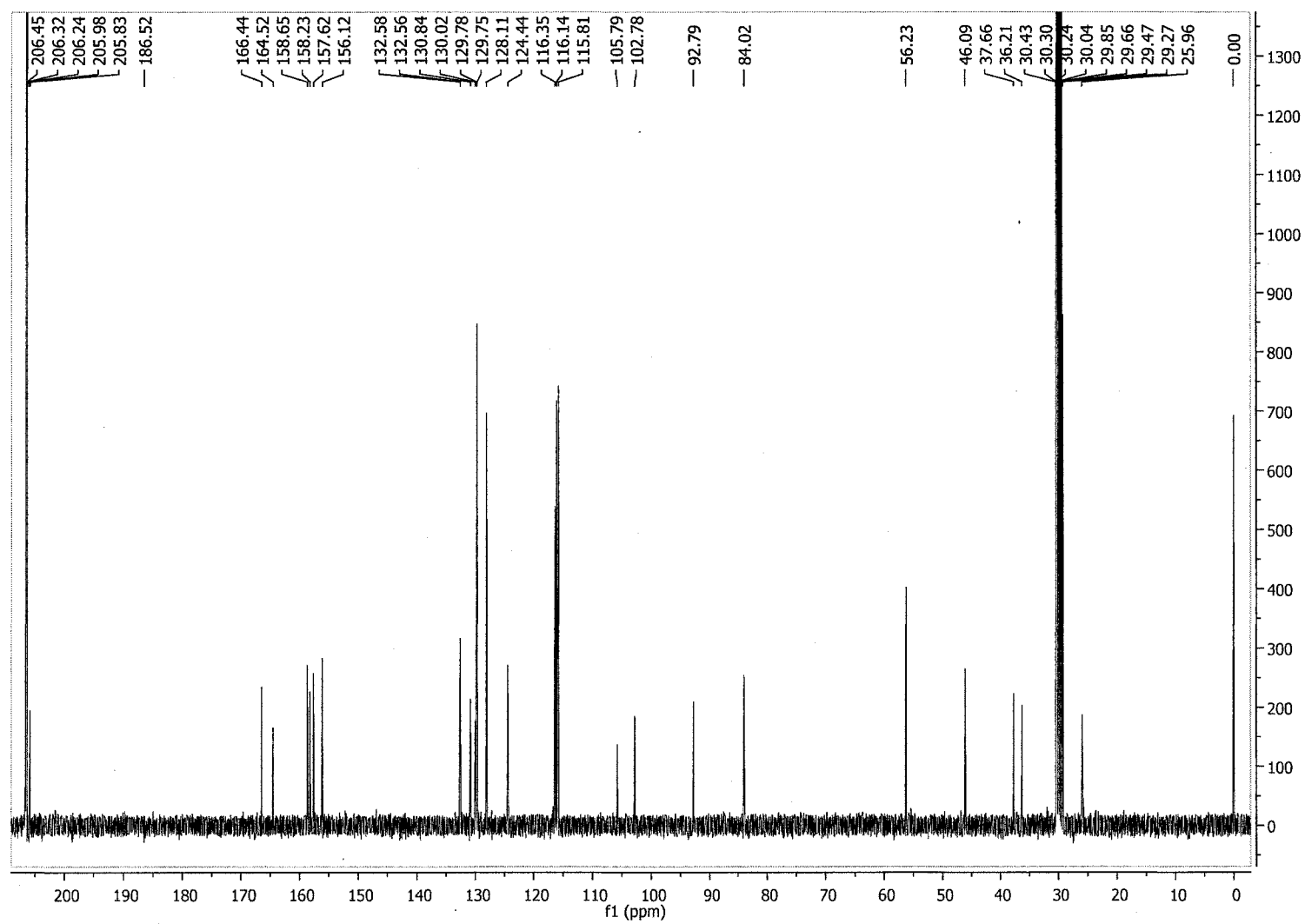
Figure S-3. ^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (-)-balsacone L, (-)-157

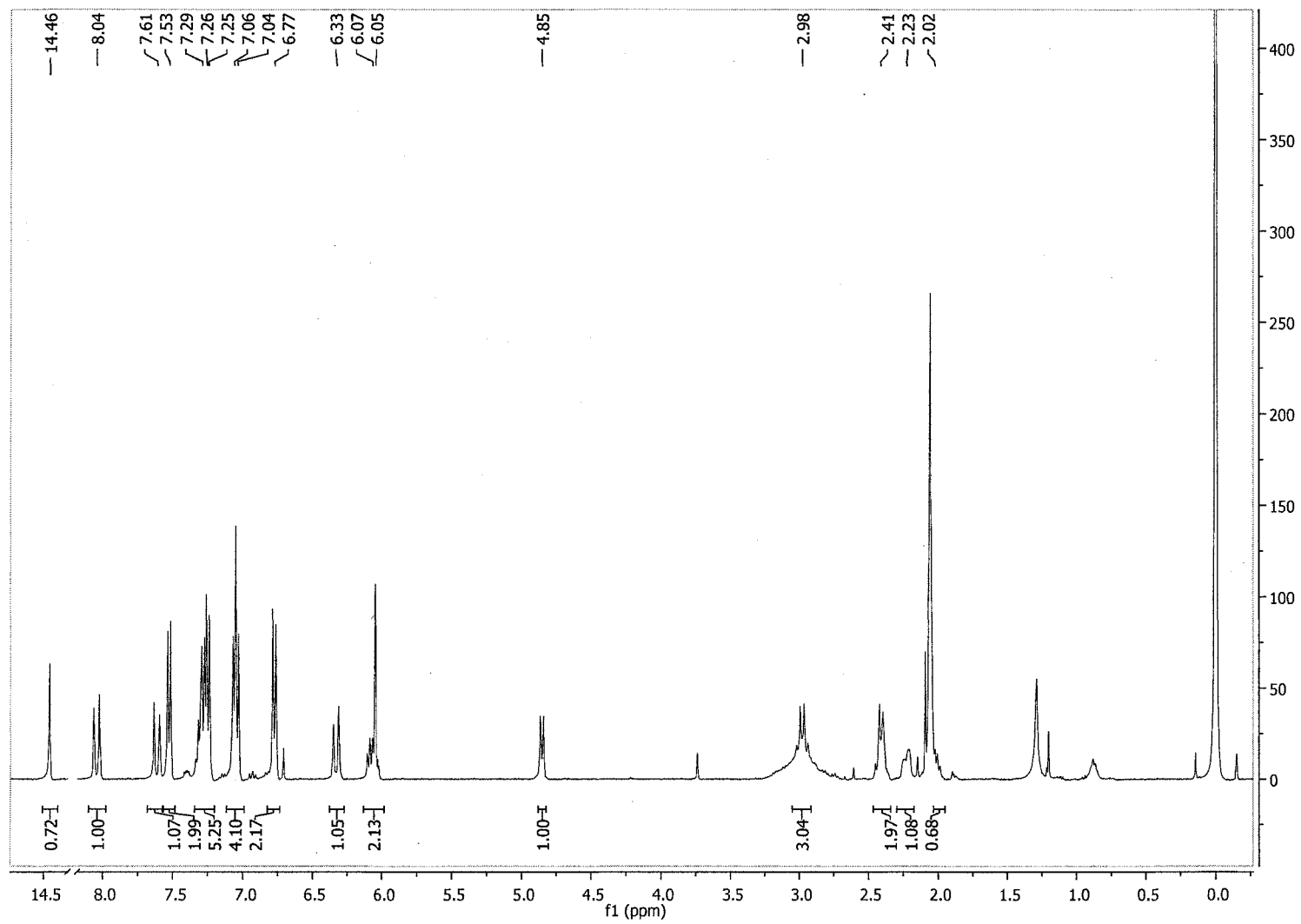
^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (-)-balsacone L, (-)-157

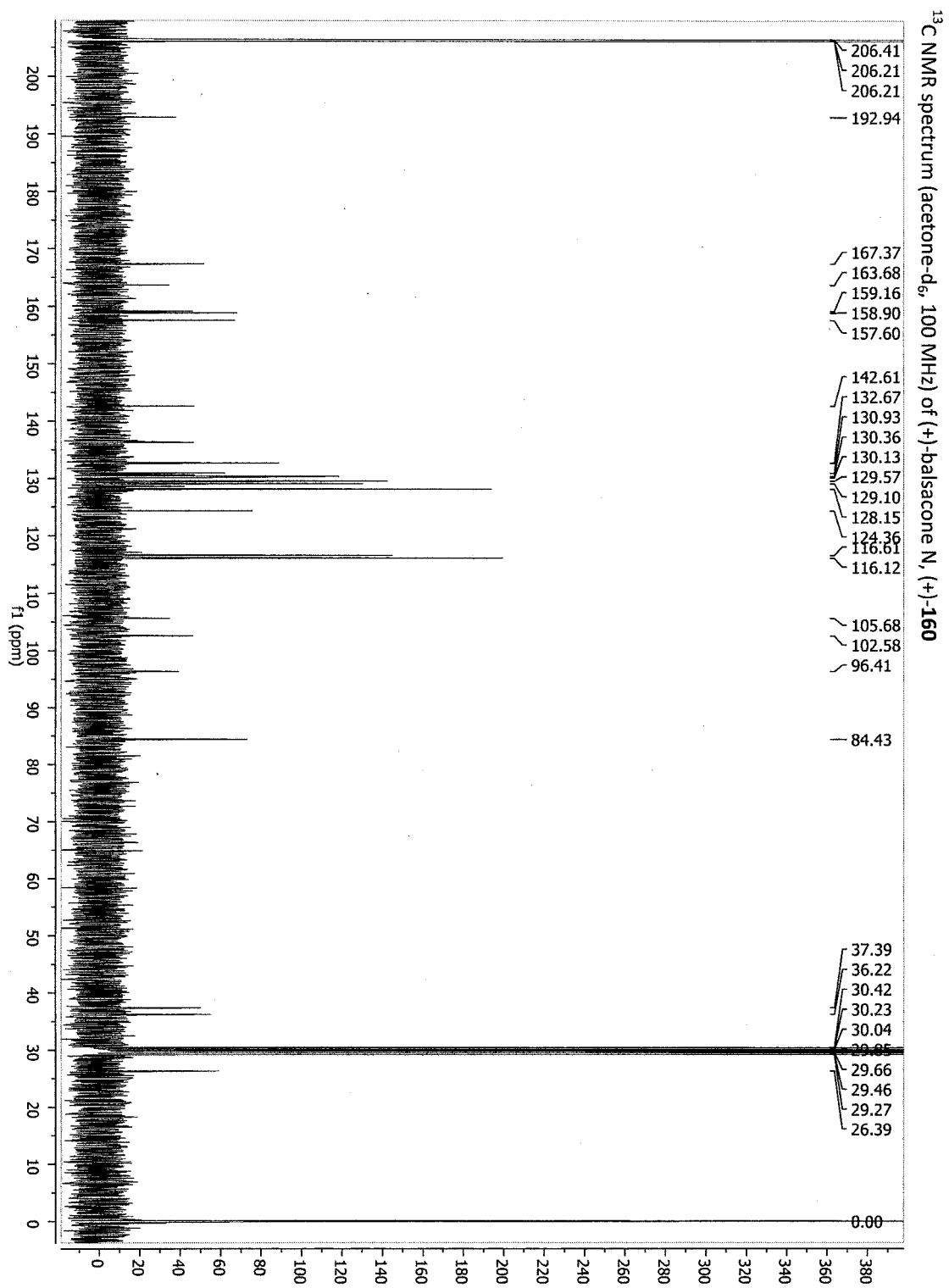


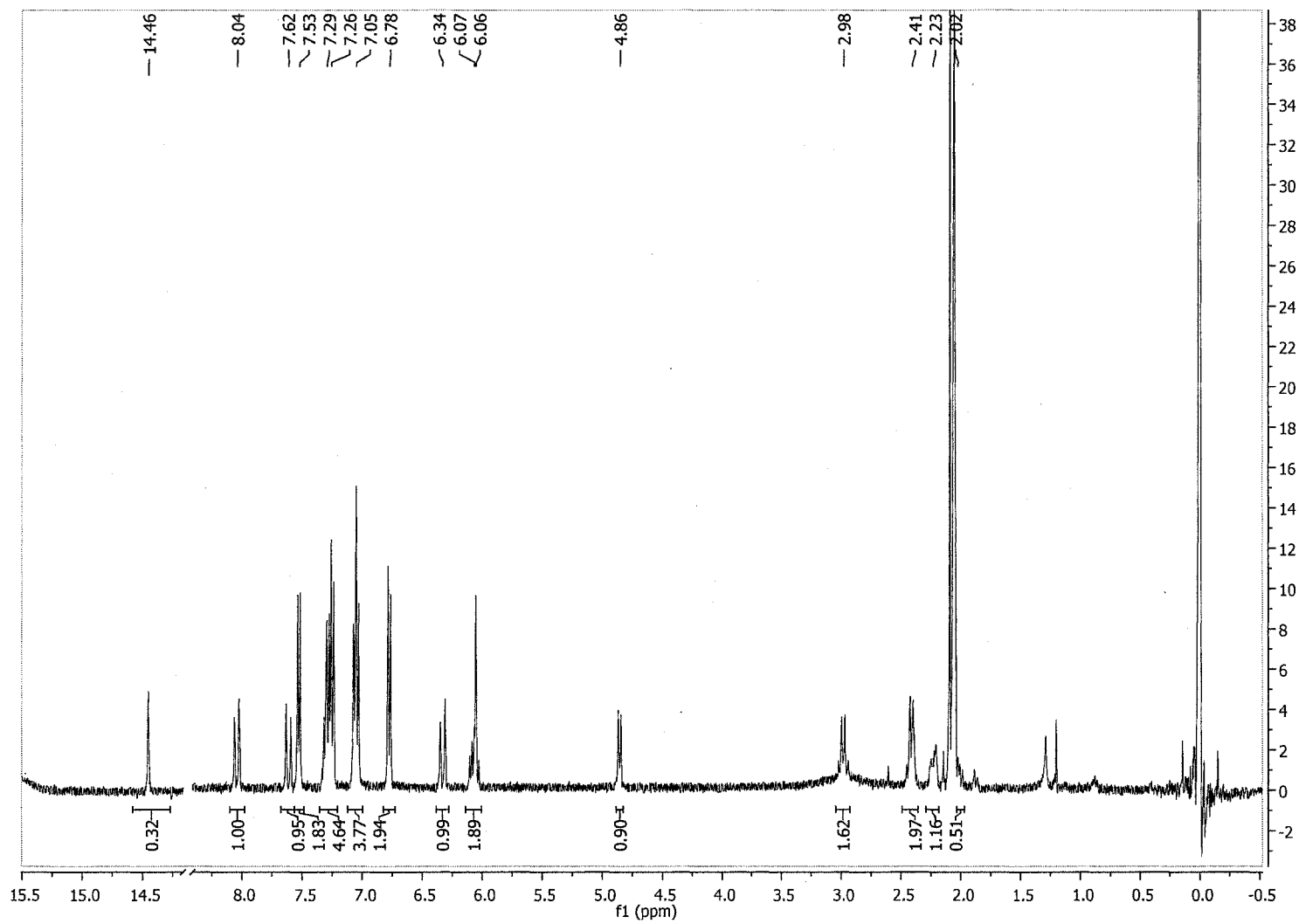


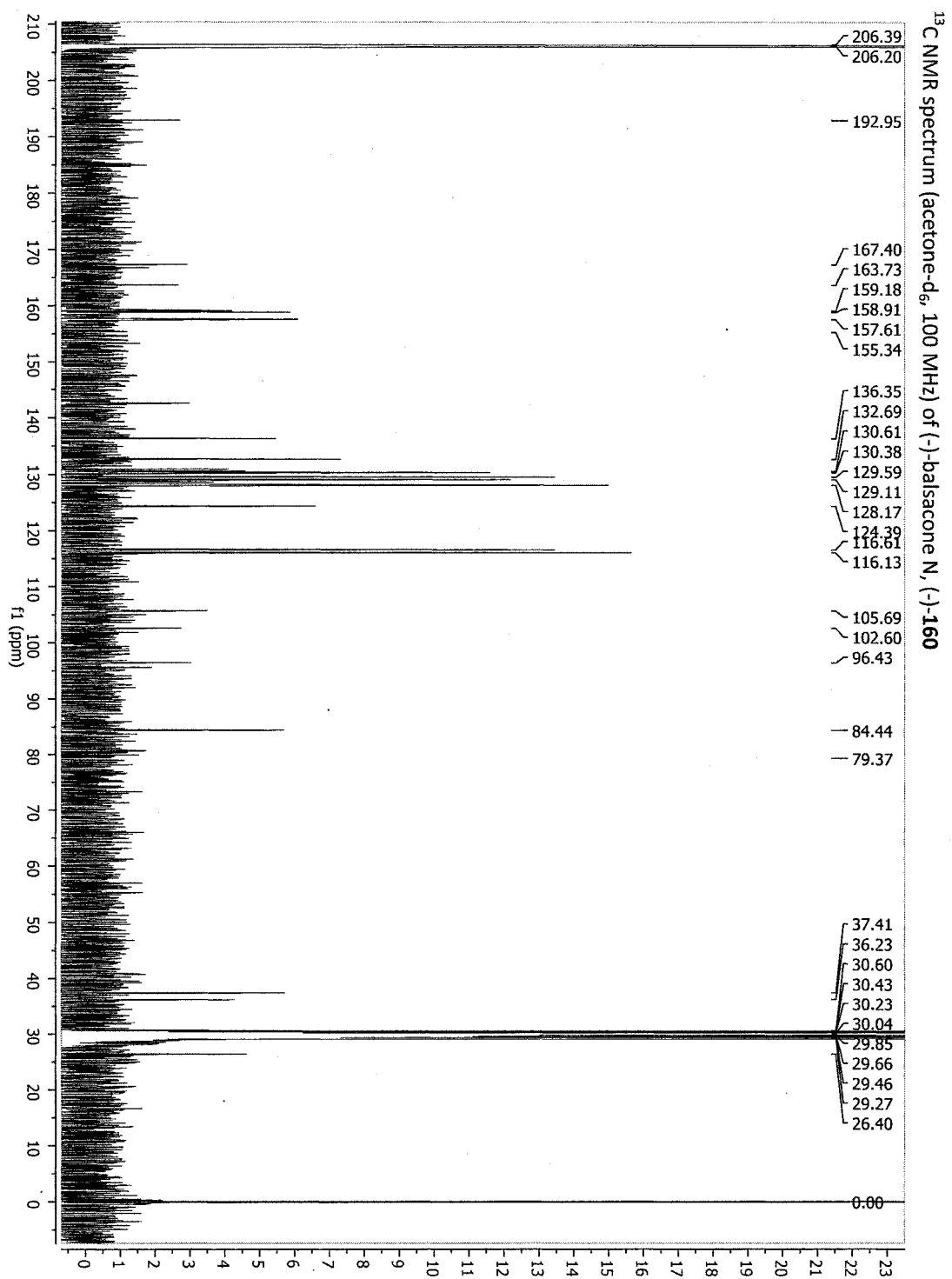


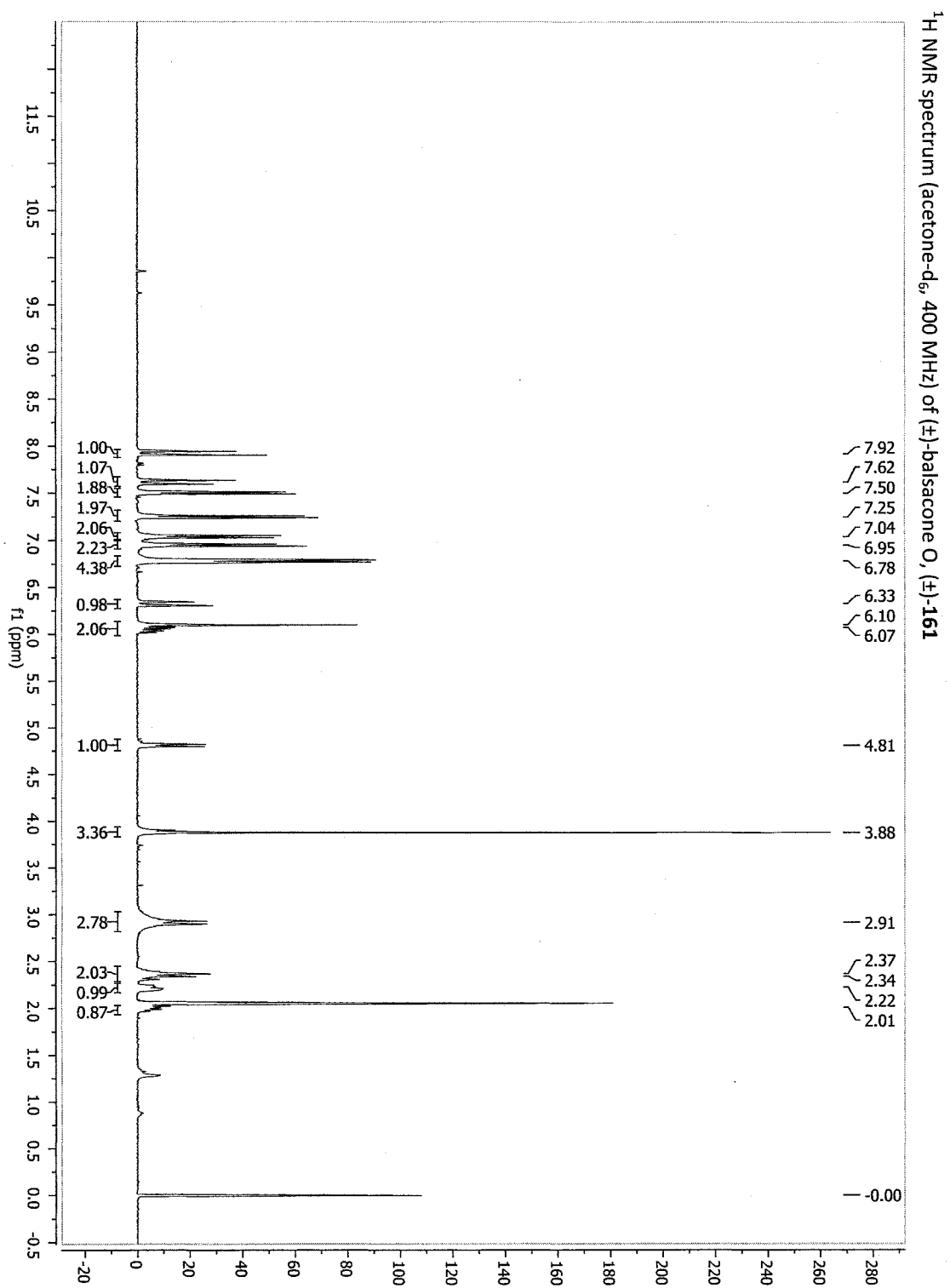
^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (-)-balsacone M, (-)-159

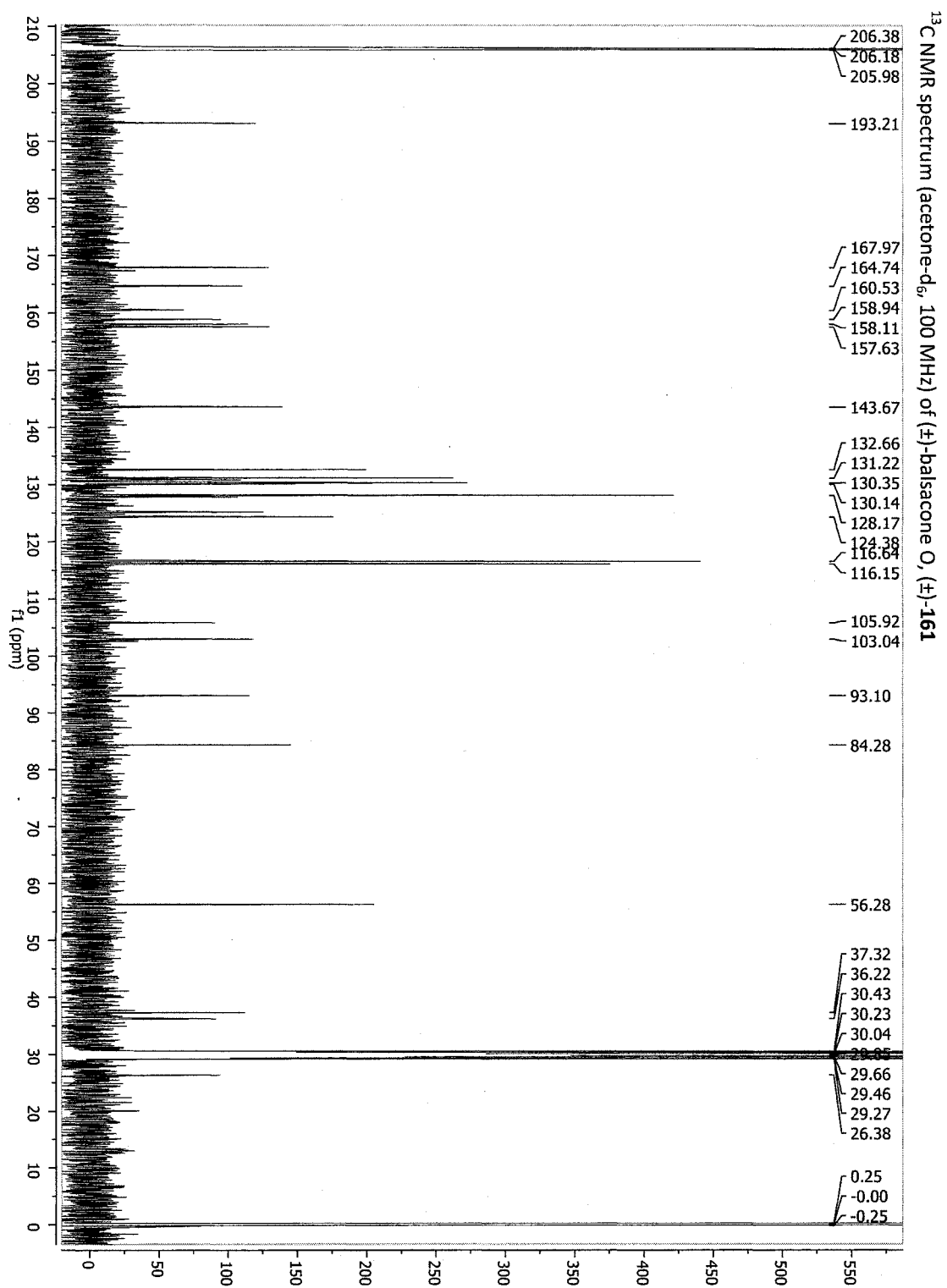
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (+)-balsacone N, (+)-160

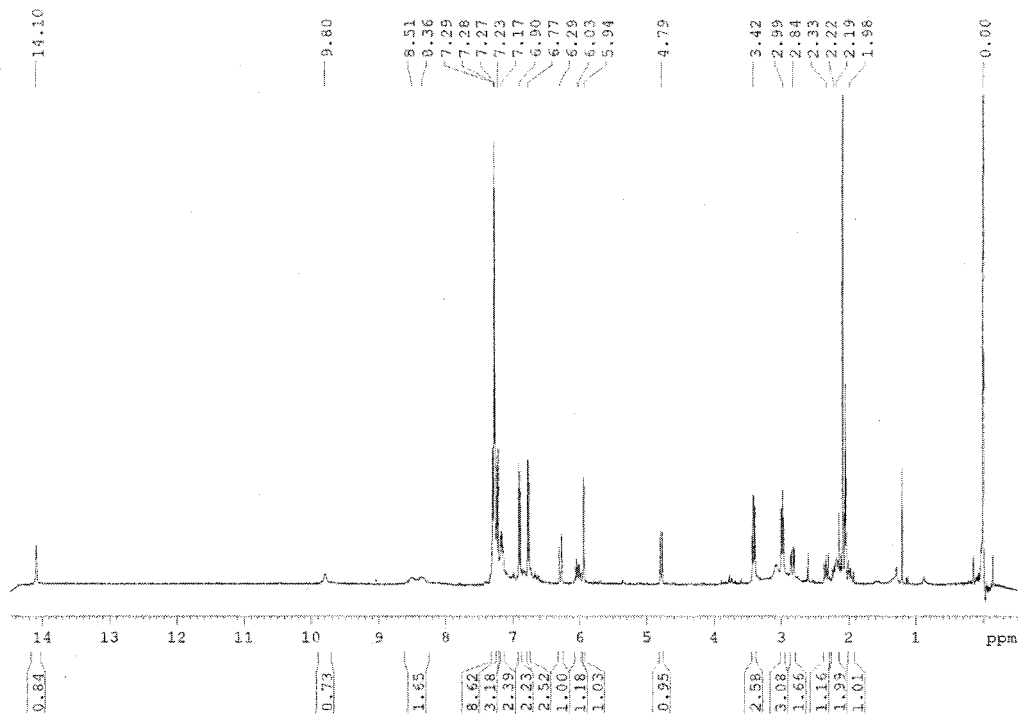
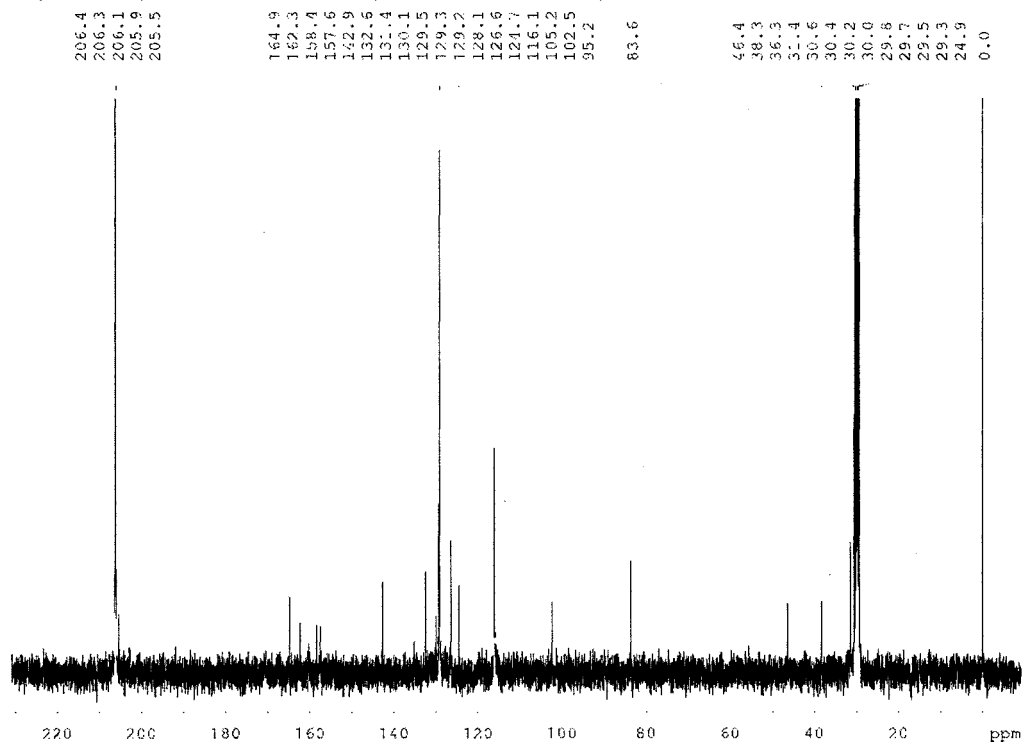


^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (-)-balsacone N, (-)-160

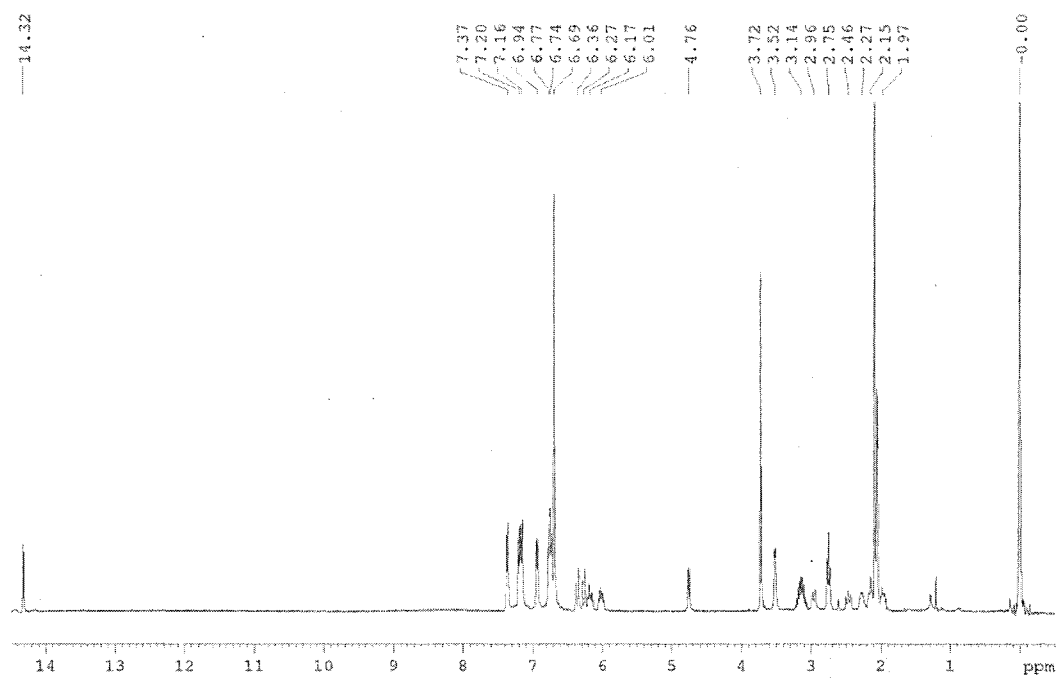




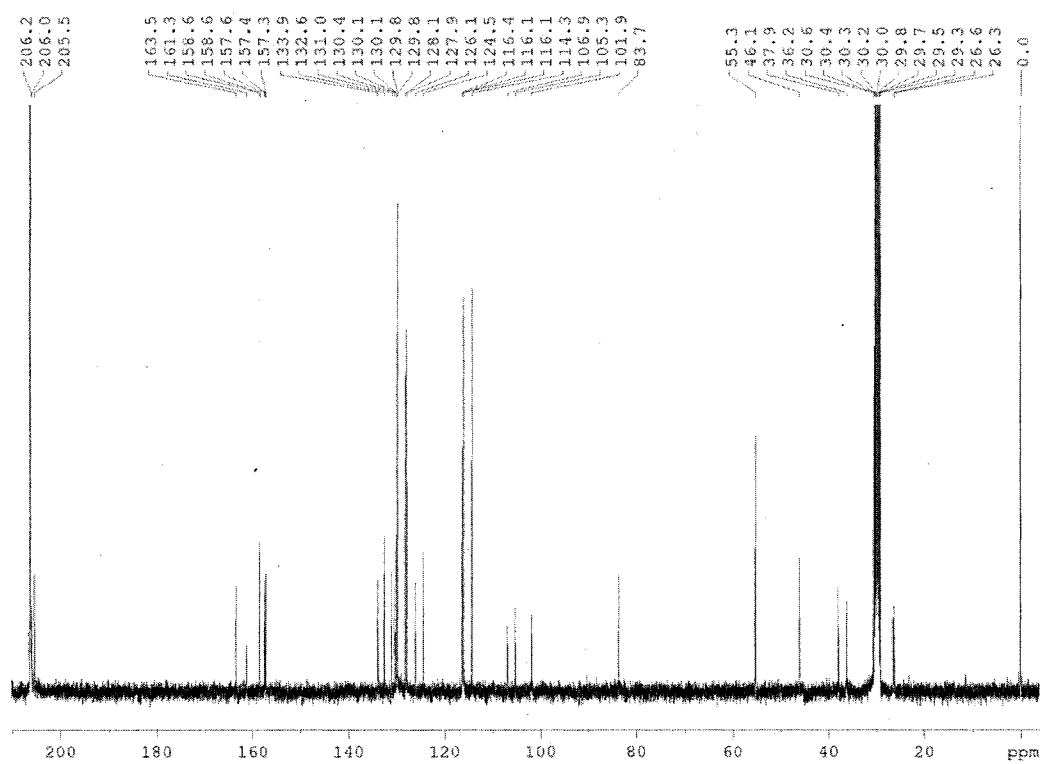


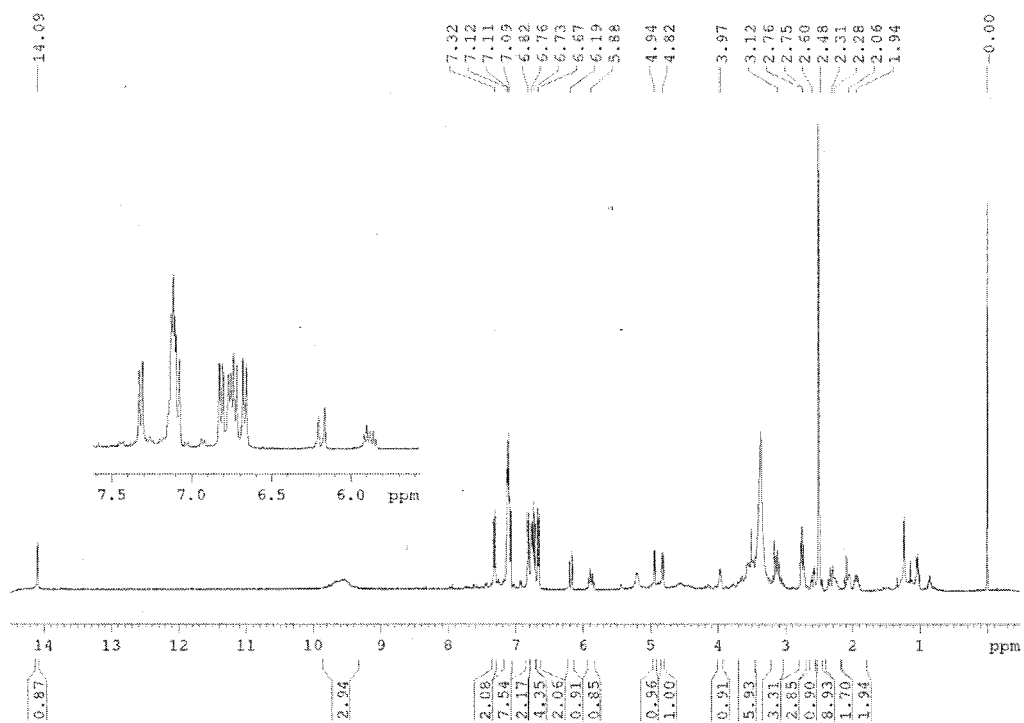
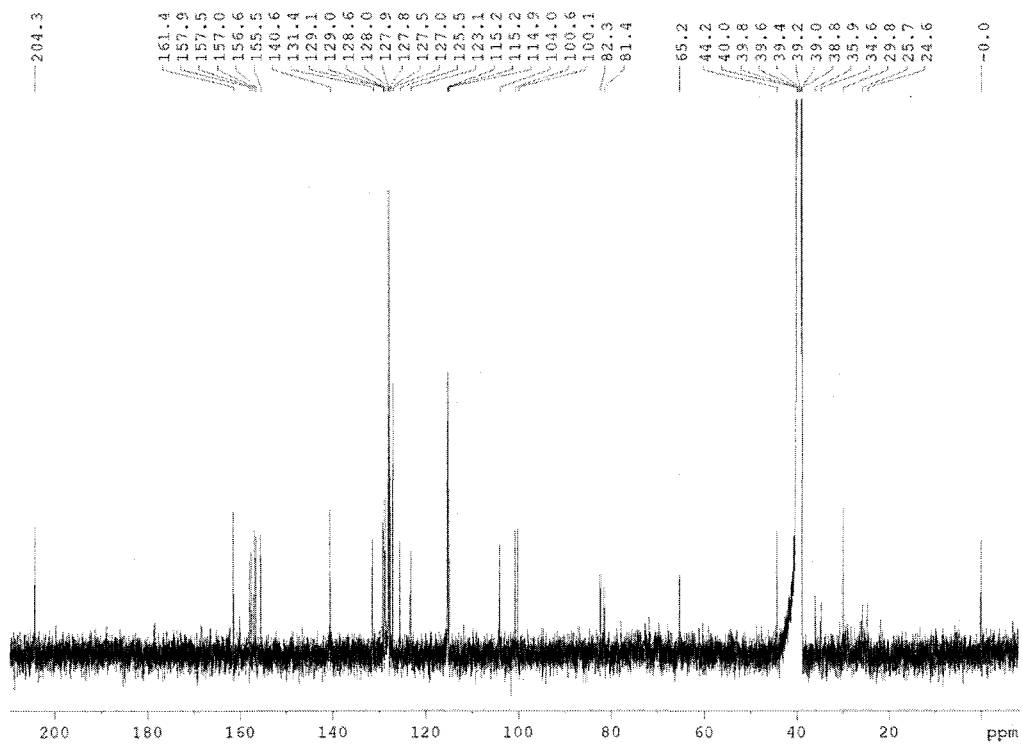
¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (±)-Balsacone P (±)-162¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (±)-Balsacone P, (±)-162

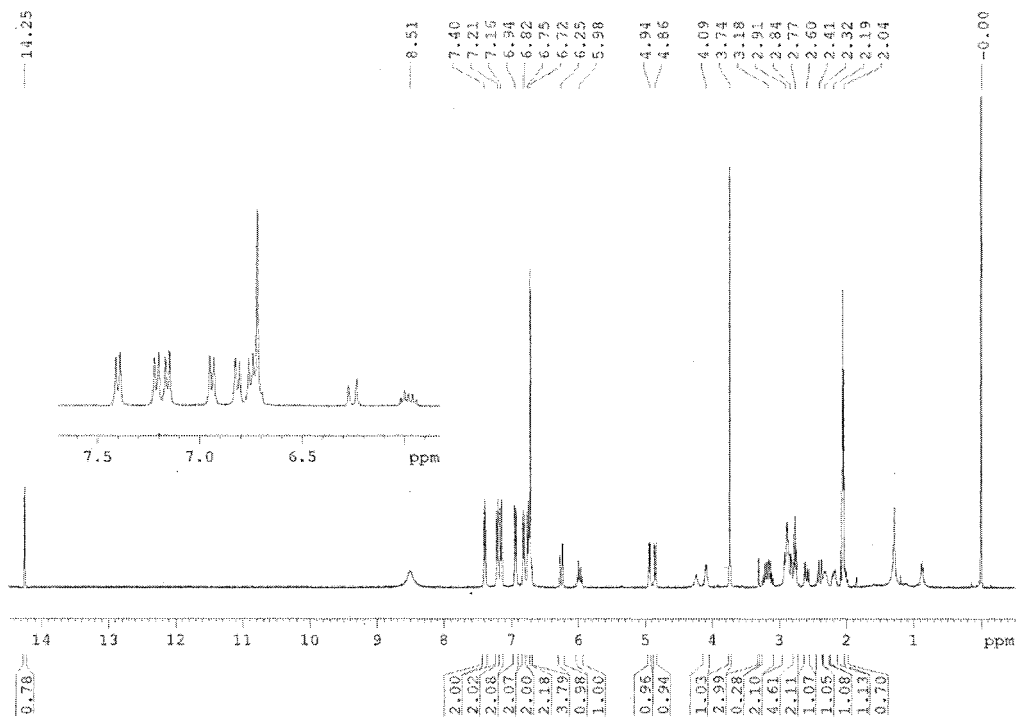
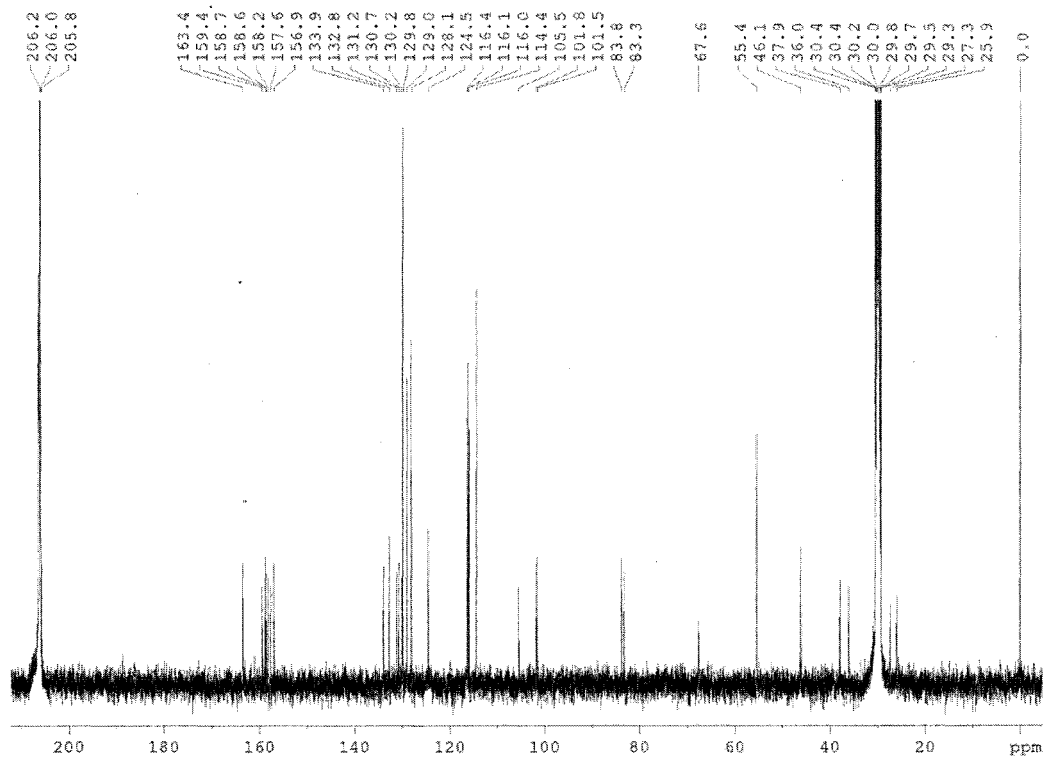
^1H NMR spectrum (CD_3OH , 400 MHz) of (\pm)-Balsacone Q, (\pm)-163

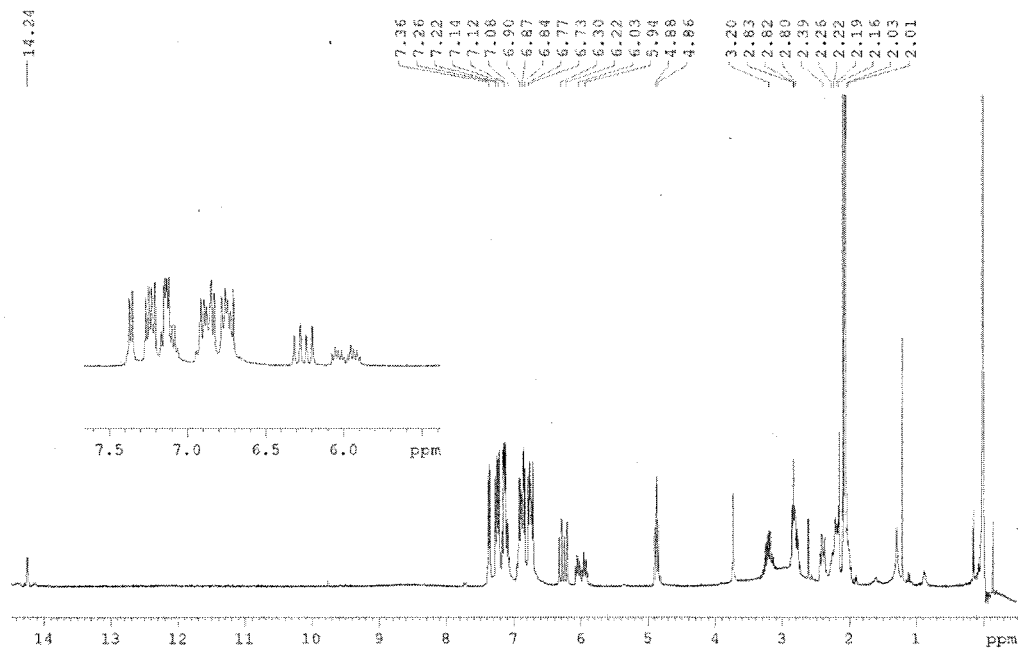
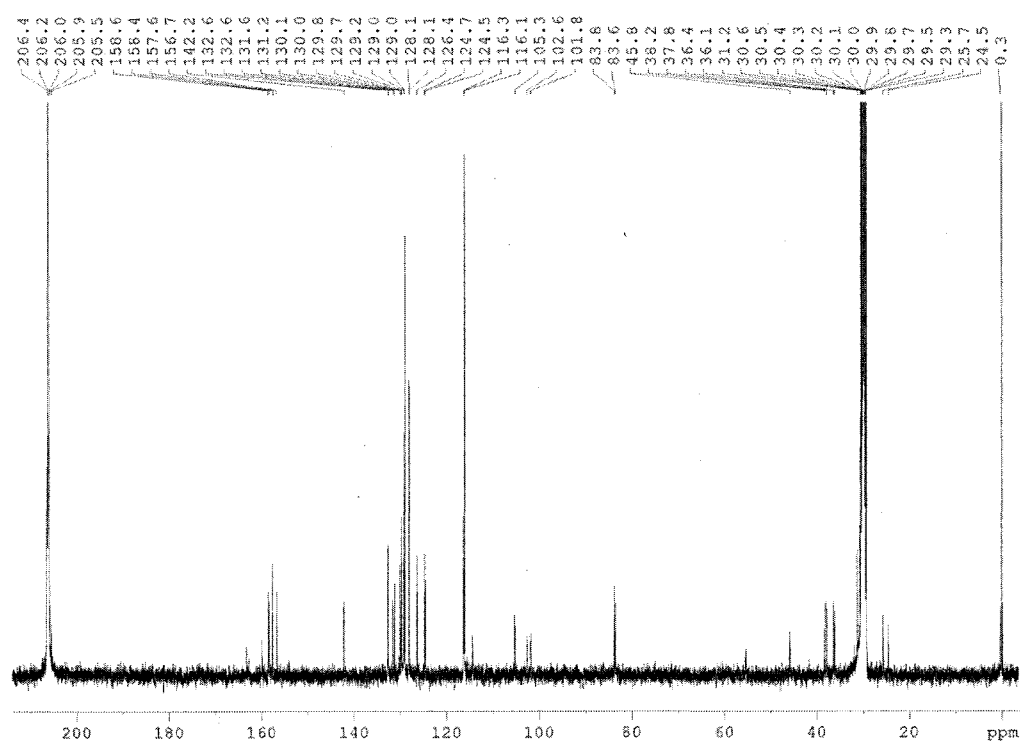


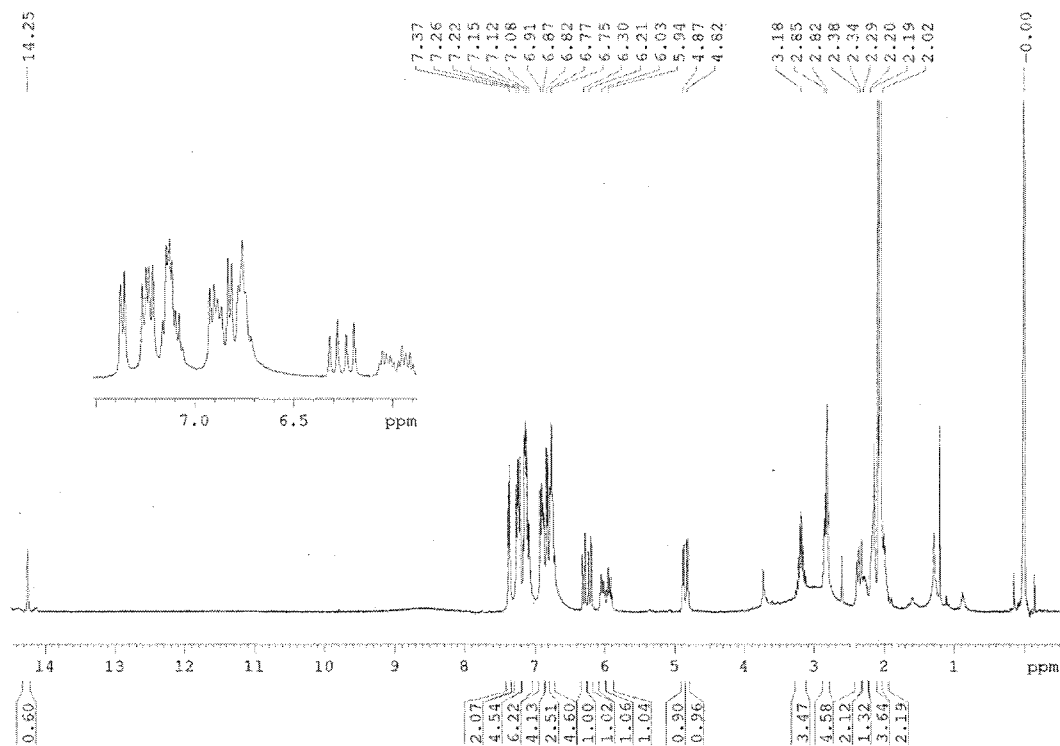
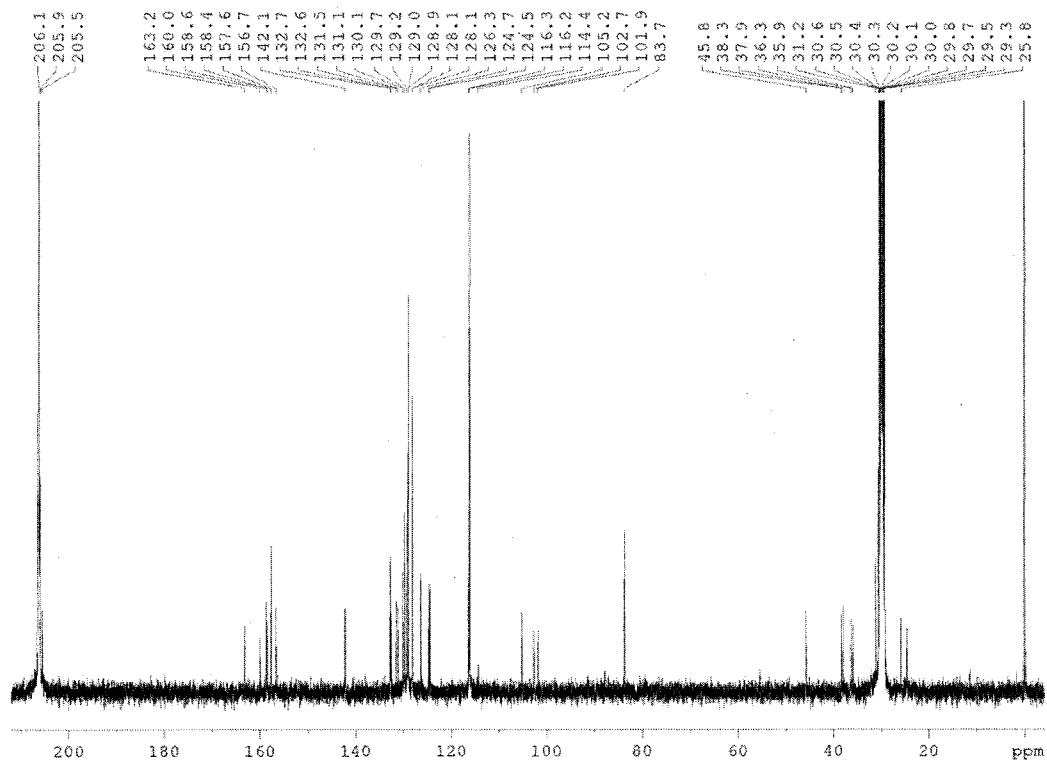
^{13}C NMR spectrum (CD_3OH , 100 MHz) of (\pm)-Balsacone Q, (\pm)-163

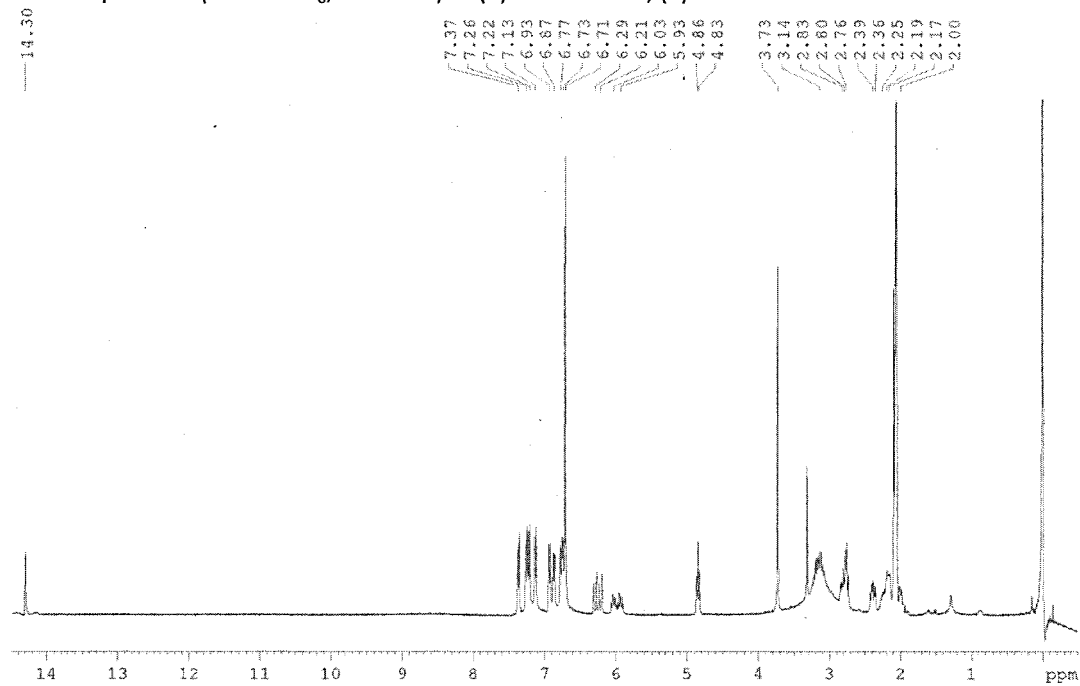
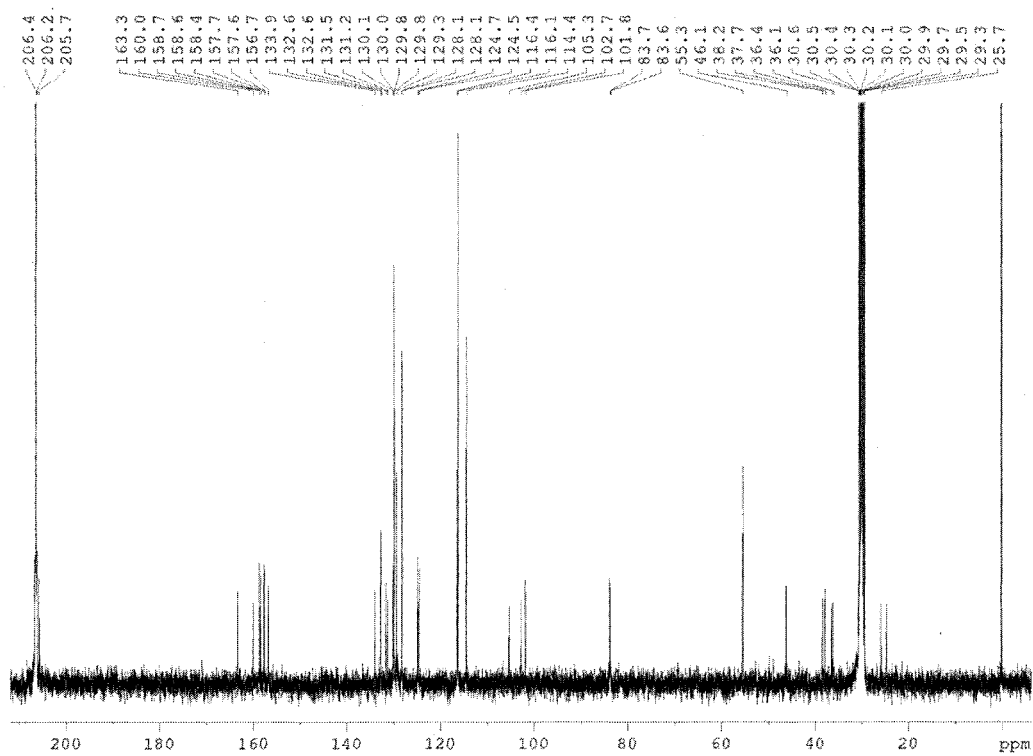


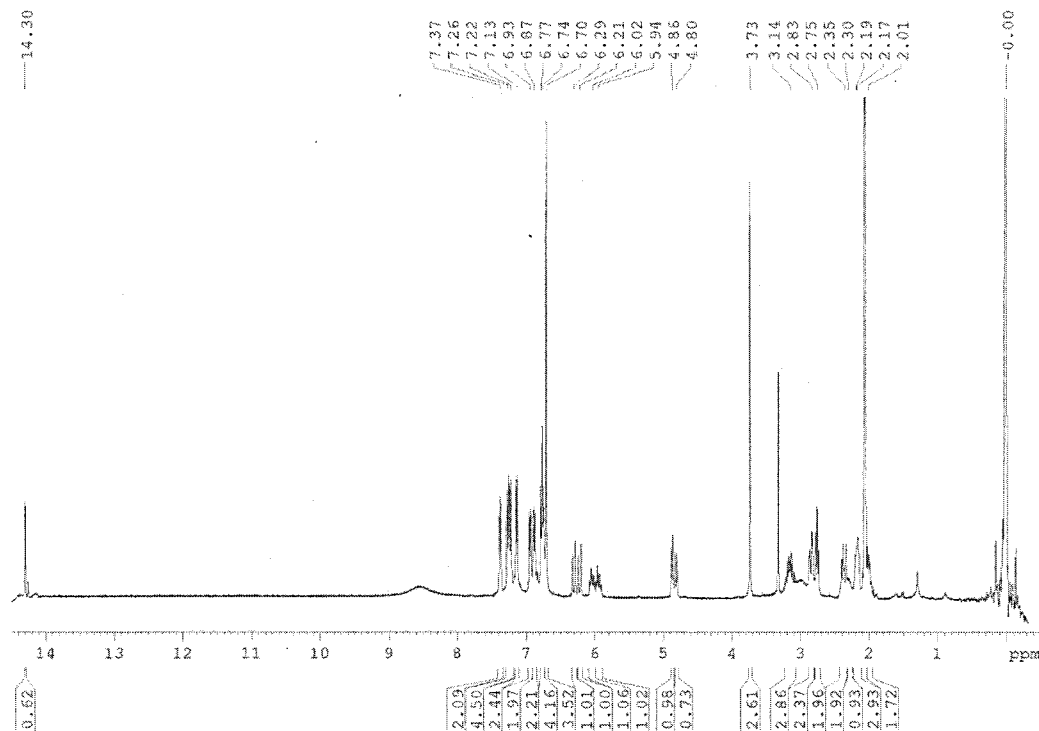
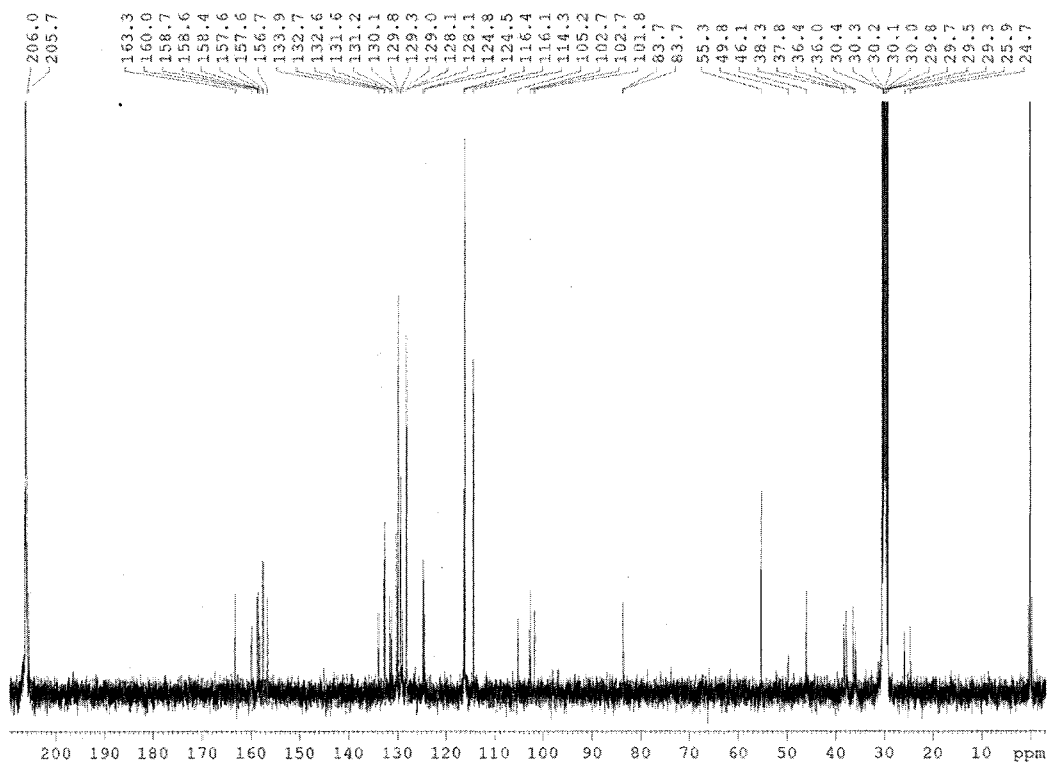
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (\pm)-Balsacone R, (\pm)-164 ^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (\pm)-Balsacone R, (\pm)-164

¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (±)-Balsacone S, (±)-165¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (±)-Balsacone S, (±)-165

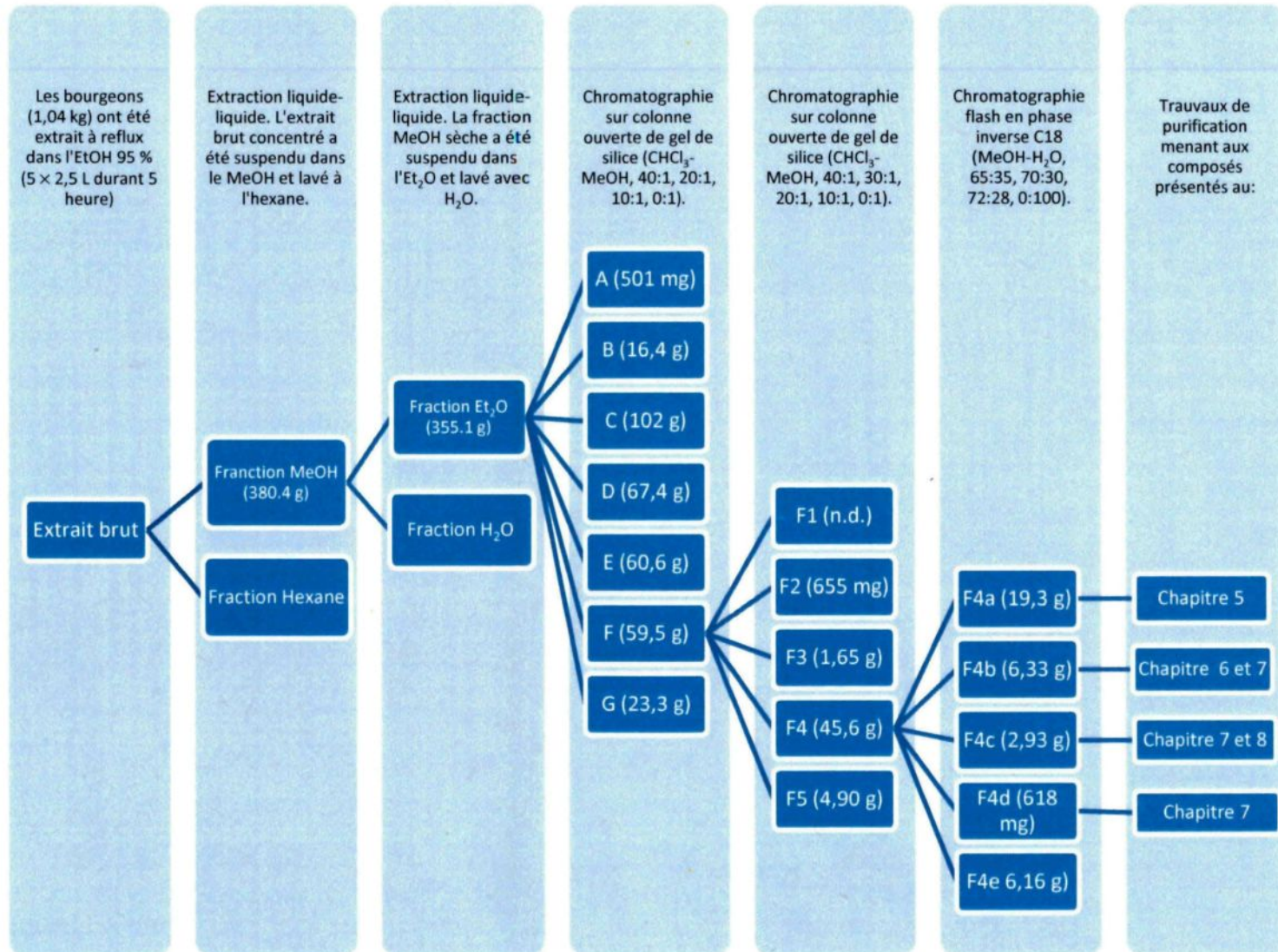
^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (\pm)-Balsacone T, (\pm)-166 ^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (\pm)-Balsacone T, (\pm)-166

¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (±)-Balsacone U, (±)-167¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (±)-Balsacone U, (±)-167

¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 400 MHz) of (±)-Balsacone V, (±)-168¹³C NMR spectrum (acetone-d₆, 100 MHz) of (±)-Balsacone V, (±)-168

^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 400 MHz) of (\pm)-Balsacone W ((\pm)-169) ^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 100 MHz) of (\pm)-Balsacone W, (\pm)-169

ANNEXE 3 ORGANIGRAMME REPRÉSENTANT LA MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT 1



ANNEXE 4 ORGANIGRAMME REPRÉSENTANT LA MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT 2

