



MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

ALEXIS ST-GELAIS

B. SC., CHIMISTE

**ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET DE
L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE *DIRCA PALUSTRIS* L.**

SEPTEMBRE 2014

Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la science.

Edgar Allan Poe

RÉSUMÉ

Aujourd'hui encore, près de la moitié des médicaments autorisés par les agences gouvernementales sont des molécules d'origine naturelle, ou des composés dérivés de celles-ci. Il existe encore un vaste potentiel de découverte de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique chez les plantes, y compris dans le domaine du cancer où les besoins sont importants. L'arbuste nord-américain endémique *Dirca palustris* L. (dirca des marais), de la famille des Thymelaeaceae, a été utilisé par les Premières Nations du nord-est du continent pour traiter le cancer. Cette plante a donc été sélectionnée pour la recherche de têtes de série potentielles. Elle a fait l'objet de peu d'études phytochimiques, et l'activité cytotoxique *in vitro* importante de ses extraits n'a pas été expliquée à ce jour.

L'objectif principal de ce projet consistait à procéder au fractionnement bioguidé d'un extrait au dichlorométhane de l'écorce, du bois et des racines du dirca des marais, en vue d'isoler un ou plusieurs composés responsables de l'activité, particulièrement envers les cellules cancéreuses du poumon A-549. Plusieurs étapes de fractionnement chromatographique successives ont permis d'isoler 33 molécules appartenant à différentes familles chimiques. Les plus notables sont deux orthoesters diterpéniques de type daphnane, la huratoxine et la wikstrotoxine A; une famille de nouveaux métabolites secondaires soufrés, baptisés dirchromones, ainsi que la dircoxépine, de structure apparentée; et plusieurs nouveaux composés phénoliques, dont des alkylignanes baptisés dircanols. On y retrouve également des lignanes, des flavones, un stilbène, une dicoumarine, une chromone, des phénylpropanoïdes et divers autres composés phénoliques. Tous les composés isolés ont été identifiés pour la première fois chez *D. palustris*. De ceux-ci, une vingtaine sont de nouvelles entités chimiques jamais rapportées dans la littérature.

Les daphnanes isolés permettent d'expliquer en partie la forte cytotoxicité des extraits (IC_{50} de 0,027 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur A-549 pour la fraction contenant les daphnanes). Les dirchromones y contribuent également par une activité cytotoxique variant selon la structure. Cette activité est sélective envers les cellules cancéreuses colorectales DLD-1. La plus importante activité est observée pour la structure de base de cette nouvelle classe de composés, la dirchromone, avec un IC_{50} de 1.0 μM contre DLD-1 (contre 9 μM et 10 μM sur WS-1 et A-549), suivie de près par les dirchromones méthoxylées. Ces composés soufrés possèdent également une activité antibactérienne (MIC_{90} entre 7.8 et 62.5 μM sur *Staphylococcus aureus*). Enfin, certains composés phénoliques isolés montrent également une activité cytotoxique.

Bref, ce projet a permis d'expliquer en partie l'activité cytotoxique de *Dirca palustris* L., en plus d'élargir les connaissances phytochimiques à son sujet. Il a notamment été l'occasion de rapporter pour la première fois des métabolites secondaires soufrés de structure originale chez les Thymelaeaceae.

REMERCIEMENTS

J'ai pu, tout au long de cette maîtrise de recherche et des travaux qui l'ont précédée, bénéficier d'un cadre de travail stimulant. J'ai pu à la fois y évoluer avec une grande autonomie et avoir accès aux ressources et conseils nécessaires à mon apprentissage et à l'atteinte de mes objectifs. Je tiens donc à remercier en premier lieu mes directeur et codirecteur, André Pichette et Jean Legault, pour leur travail acharné à développer, financer et améliorer constamment le laboratoire LASEVE, et pour leur encadrement.

Le précieux appui de Vakhtang Mshvildadze (techniques de séparation et de criblage phytochimique), de François Simard (procédures générales en laboratoire), de Carole Grenon (équipements chromatographiques), de Balla Sylla (synthèse) et de Serge Lavoie (RMN), a également été essentiel à la bonne marche de mon projet dans toutes ses facettes. Du côté des tests d'activités biologiques, le travail de Catherine Dussault et de Karl Lalancette a été extrêmement apprécié.

Le parcours menant à l'obtention de la maîtrise serait bien solitaire sans collègues et amis avec lesquels échanger. À cet égard, j'aimerais particulièrement remercier Hubert Marceau, Sylvain Mercier, Laurie Caron, Marie-Anne Boucher et Pierre-Yves Fleury pour leur bonne compagnie tout au long de mes études.

La mise en place et la réalisation du projet d'étude du dirca des marais ont été possibles par une suite d'heureux hasards, à laquelle plusieurs personnes ont contribué. Je remercie à cet effet Sylvain Mercier de m'avoir suggéré de consulter la *Flore laurentienne* dans son intégralité pour trouver l'inspiration d'un projet. Merci à Serge Lantagne de la Direction des laboratoires d'expertises et d'analyses alimentaires du Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Pêcheries du Québec, de m'avoir indiqué un premier site sur lequel trouver une plante que je désespérais de trouver. Je suis reconnaissant à Vakhtang Mshvildadze et André Pichette d'avoir pris le risque de me laisser faire quelques tests préliminaires sans filet, avec des résultats encourageants ayant permis de lancer le projet. Je lève mon chapeau à Hubert Marceau pour avoir le premier lancé l'idée que du soufre pouvait être présent dans des molécules que je peinais à interpréter. J'exprime ma gratitude à Mme Jacqueline Desrosiers des Sentiers de la Presqu'île, à Repentigny, de m'avoir laissé prélever de nombreux plants de dirca dans sa magnifique érablière privée. Et je remercie enfin tous ceux qui m'ont assisté dans la récolte de mes échantillons : Myriam Gauthier, Hubert Marceau, mes parents Dany St-Gelais et Marie-Hélène Troestler et mon frère Xavier St-Gelais.

Évidemment, le soutien familial est précieux dans le cadre des études supérieures. Merci à celle qui partageait ma vie pendant mes études et à ma famille de leur appui indéfectible. Je souligne particulièrement la contribution de Xavier St-Gelais, qui fournit une perspective historique de grand intérêt sur l'étrange nom de « bois de plomb » donné à *Dirca palustris*. Le fruit de ses recherches peut être consulté en annexe II de ce mémoire.

Je remercie enfin le CRSNG et le FRQNT, dont l'appui financier m'a permis de me consacrer pleinement à mes recherches, et ce dès le baccalauréat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
CHAPITRE I - INTRODUCTION	1
Mise en contexte.....	2
Objectif général.....	6
Objectifs spécifiques	6
Division du mémoire	6
CHAPITRE II – REVUE DE LA LITTÉRATURE	8
A. Le dirca des marais	9
Les Thymelaeaceae	9
Le genre <i>Dirca</i>	12
L'espèce <i>Dirca palustris</i> Linné	13
Phytochimie et bioactivité des dirca	21
B. Synthèse.....	25
Approches de couplage carbone-carbone	26
Génération de la chromone	31
Chaîne soufrée	36
Substitution de l'aromatique	40
Bilan des voies de synthèse proposées.....	43
CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE	45
New Cytotoxic Organic Sulfur Compounds Isolated from <i>Dirca palustris</i> L. (Thymelaeaceae)	46
Présentation	46
Résumé.....	46
Article	47

CHAPITRE IV – ISOLATION ET CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS	62
Fractionnement bioguidé à partir de la récolte de Repentigny (travaux de maîtrise)	63
Choix de la méthode d'extraction.....	63
Schéma de fractionnement.....	65
Composés isolés à partir de la récolte de Repentigny (travaux de maîtrise)	67
Série AS02101	67
Série AS02095	68
Série AS02107	68
Série AS02109	70
Série AS02111	71
Série AS02114	72
Série AS02116	74
Série AS02134	74
Série AS02136	77
Fractionnement et composés isolés à partir de la récolte de Québec (travaux du baccalauréat)	78
Activités biologiques des composés isolés.....	85
Cytotoxicité des composés phénoliques et des dirchromones	85
Activités biologiques des daphnanes	87
Activités antibactériennes.....	89
CHAPITRE V – AVANCEMENT DES TRAVAUX DE SYNTHÈSE DES DIRCHROMONES	90
Couplage de Heck.....	91
Chaîne soufrée	91
2-Halogénochromone	96
Couplage de Heck.....	101
Réaction de Wittig.....	101
CHAPITRE VI – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	105
RÉFÉRENCES	109
ANNEXE I – VOIE BIOSYNTHÉTIQUE HYPOTHÉTIQUE DES DIRCHROMONES	120
ANNEXE II – LE BOIS DE PLOMB : UNE NOTE ÉTYMOLOGIQUE	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Nombre de médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis de 1950 à 2010 par milliard de dollars US dépensé dans la recherche et le développement, en dollars constants de 2008 (Scannell et al., 2012).....	2
Figure 2. Composés typiques des diterpènes de type tigiane (phorbol, 1) et daphnane (daphnétoxine, 2). Ces derniers peuvent être macrocycliques (kirkinine B, 3).	11
Figure 3. Structure de la daphnorétine, une bicoumarine commune chez les Thymelaeaceae.	12
Figure 4. Gauche : provinces et États où l'on retrouve <i>Dirca palustris</i> L. (United States Department of Agriculture, 2012). Droite : distribution de <i>D. palustris</i> au Québec (Gagnon et al., 1985).....	14
Figure 5. <i>Dirca</i> des marais dans son habitat, en sous-bois d'érablière mature, accompagné ici de l'if du Canada. Photo : Myriam Gauthier.....	15
Figure 6. Détails anatomiques du <i>dirca</i> des marais. A : Feuilles et brindilles. Les tiges de l'année sont encore vertes, non lignifiées. B : Insertion des racines superficielles. C : Fruits, par grappes d'un à trois, d'une forme rappelant un citron. D : Détail de l'aspect segmenté des branches. Photos : Myriam Gauthier et personnelles.	17
Figure 7. Triglycérides isolés des graines du <i>dirca</i> des marais (Ramsewak et al., 2001).	22
Figure 8. Glycosides phénoliques des brindilles du <i>dirca</i> des marais (Ramsewak et al., 1999).	23
Figure 9. Composés antileucémiques isolés de <i>Dirca occidentalis</i> , avec leurs valeurs d'IC50 et la lignée cellulaire testée (Badawi et al., 1983; Suh et al., 1995).....	24
Figure 10. Squelette de base des dirchromones isolées de <i>Dirca palustris</i> L. (voir chapitre III).....	25
Figure 11. Principales stratégies de synthèse envisagées pour l'obtention des dirchromones.	26
Figure 12. Couplage de Heck palladocatalytique.....	27
Figure 13. Couplages de Wittig possibles.	28
Figure 14. Métathèse croisée (Schuster and Blechert, 1997).....	28
Figure 15. Voies de synthèse possibles avec les réactifs de Grignard.	29
Figure 16. Condensation d'une acétophénone et d'un aldéhyde (Oyama et al., 2011).....	30

Figure 17. Couplage carbonylatif (Oyama et al., 2011).....	31
Figure 18. Obtention de triflates avec l'anhydride triflique. Le produit 21 n'est en réalité pas obtenu (Pierson et al., 2010).	32
Figure 19. Obtention de la 2-bromochromone à partir de la 4-hydroxycoumarine.....	33
Figure 20. Synthèse de la 2-chlorochromone à partir d'un dérivé acrylique (Levas and Levas, 1960).	33
Figure 21. Couplage de la chaîne soufrée avant cyclisation de la chromone	34
Figure 22. Voies d'obtention possible de la 2-vinylchromone.....	35
Figure 23. Obtention d'un halogénoalcène anti-Markovnikov.....	36
Figure 24. Préparation du méthylsulfinyléthène (22).....	37
Figure 25. Voies d'obtention du méthylsulfinylpropenal 35.	39
Figure 26. Voies de synthèse de l'alcyne 37.	40
Figure 27. Monosubstitutions d'une chromone déjà formée.....	42
Figure 28. Voies de synthèse les plus prometteuses selon la revue de littérature. Les produits marqués d'un astérisque sont commercialement disponibles.	44
Figure 29. Première partie du schéma de fractionnement de <i>Dirca palustris</i> . Les séries sont les fractions obtenues par HPLC préparative. Les IC50 présentés ont été obtenus avec la lignée cellulaire cancéreuse A-549.	65
Figure 30. Seconde partie du schéma de fractionnement de <i>Dirca palustris</i> . Les séries sont les fractions obtenues par HPLC préparative. Les IC50 présentés ont été obtenus avec la lignée cellulaire cancéreuse A-549.	66
Figure 31. Structures du (±)-laricirésinol (70) et du (-)-syringarésinol (71).	68
Figure 32. Structure de la dircoxépine.....	68
Figure 33. Structure de la 8-hydroxy-7-méthoxydirchromone.....	70
Figure 34. Structure de la 6-hydroxy-7-méthoxydirchromone.....	71
Figure 35. Structure de la 3,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (75), du syringaldéhyde (76), du sinapaldéhyde (77) et du (-)-pinorésinol (78).....	73
Figure 36. Structure de la daphnorétine.....	74

Figure 37. Structure de la huratoxine (80), de la wikstrotoxine A (81), et des mélanges racémiques d'octadécylDIRCANOL (82+83) et d'eicosylDIRCANOL (84+85).	75
Figure 38. Structures de la 5-hydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone (86) et de la trans-3,3',5,5'-tétraméthoxystilbène (87).....	77
Figure 39. Structure de la 6,7-diméthoxyflavone.	79
Figure 40. Structure de la 5-méthoxy-2-(2-méthoxyphényl)-4H-pyran-4-one.	79
Figure 41. Structures du p-hydroxy-phényl-trans-férulate (90) et la 2-(2-hydroxyéthyl)-chromone (91).....	81
Figure 42. Structure du (E)-3-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-N-(4-hydroxyphényl)acrylamide.	83
Figure 43. Structure des stéréoisomères du 7-méthoxysyringylglycérol.....	84
Figure 44. Relation entre le logP et la cytotoxicité des dirchromones pour chacune des lignées cellulaires étudiées.	87
Figure 45. Courbes dose-réponse sur la lignée A-549 des fractions AS02102B et AS02118C, représentant les deux étapes précédant l'isolation des daphnanes. ● : Résazurine, ○ : Hoechst. La forte dispersion des points du test de Hoechst sur AS02118C a parfois été observée lors du fractionnement, sans être expliquée.....	88
Figure 46. Structures visées par l'aspect synthétique du projet de maîtrise. Tous les dérivés mono- et di-substitués possibles sont ciblés.	91
Figure 47. Premier essai de synthèse du méthylsulfinyléthène.	92
Figure 48. Estérification de l'intermédiaire méthoxylé pour vérifier l'obtention du chlorure de méthylsulfinyle.	93
Figure 49. Deuxième tentative de synthèse du chlorure de méthylsulfinyle.	93
Figure 50. Synthèse du méthylsulfinyléthène par déshydratation et oxydation.....	94
Figure 51. Montage expérimental nécessaire à la déshydratation du méthylthioéthanol sur KOH fondu.....	95
Figure 52. Production du méthylvinylsulfide par alkylation du diméthyldisulfide.	96
Figure 53. Procédure modifiée pour l'acylation du phénol en vue de le cycliser en 2-chlorochromone.	97
Figure 54. Conditions modifiées pour générer le chlorure d'acyle.....	97

Figure 55. Synthèse de l'ester acrylique en vue de la migration de Fries.....	98
Figure 56. Conditions modifiées pour l'acylation de Friedels-Craft.....	99
Figure 57. Migration de Fries pour obtenir un phénol cyclisable en chromone 2-halogénée.	100
Figure 58. Cyclisation de la phénone en chromone par ajout lent de NaOH dilué.	100
Figure 59. Conditions utilisées pour le couplage de Heck.	101
Figure 60. Chloration du DMSO en condition basique.....	102
Figure 61. Tentative de réduction de l'acide carboxylique après estérification.....	103
Figure 62. Synthèse de la 2-hydroxyméthylchromone par cyclisation d'une phénone et réduction d'ester (Helguera et al., 2013).....	104
Figure 63. Biosynthèses des chromones par anabolisme (polyacétates, A) ou catabolisme (à partir des flavonoïdes, B).....	121
Figure 64. Biosynthèse exploratoire d'une dirchromone à partir de la méthionine.	123
Figure 65. Biosynthèse exploratoire d'une dirchromone à partir de la cystéine.	124
Figure 66. Lien métabolique possible entre les dircoxépinés et les dirchromones.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Toxicités répertoriées des Thymelaeaceae (tiré de Borris et al., 1988).....	10
Tableau 2. Utilisations médicinales traditionnelles du dirca des marais par les Amérindiens.....	20
Tableau 3. Comparaison sommaire de différentes méthodes d'extraction des tiges, racines et écorce broyées de <i>Dirca palustris</i> sur la base de leur activité cytotoxique par le test Hoechst et de leur rendement	64
Tableau 4. Données RMN des deux diastéréoisomères de 7-méthoxysyringylglycérol (DMSO-d6).84	
Tableau 5. Cytotoxicité des composés identifiés isolés de <i>Dirca palustris</i> , mesurée par le test de Hoechst.....	86
Tableau 6. Activité antibactérienne des composés soufrés isolés de <i>Dirca palustris</i>	89

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Mise en contexte

Depuis plusieurs années, l'industrie pharmaceutique s'inquiète de l'augmentation importante des coûts en recherche et en développement associés à la découverte, l'évaluation, l'approbation et la mise en marché d'un médicament. Cette tendance (Figure 1) est baptisée loi d'Eroom, par opposition à la loi de Moore qui traduit l'augmentation exponentielle de la capacité des circuits électroniques pour un même coût. Concrètement, tous les neuf ans depuis 1950, le nombre de médicaments obtenus par dollar investi en recherche a diminué de moitié environ (Scannell et al., 2012). Cette diminution du rendement sur l'investissement n'encourage pas les administrateurs des grandes entreprises pharmaceutiques à maintenir leurs activités de recherche (Carter, 2011). Cette réaction risque d'aggraver le problème, en réduisant davantage le nombre de nouveaux médicaments disponibles ou en augmentant fortement le prix de ceux-ci (Scannell et al., 2012).

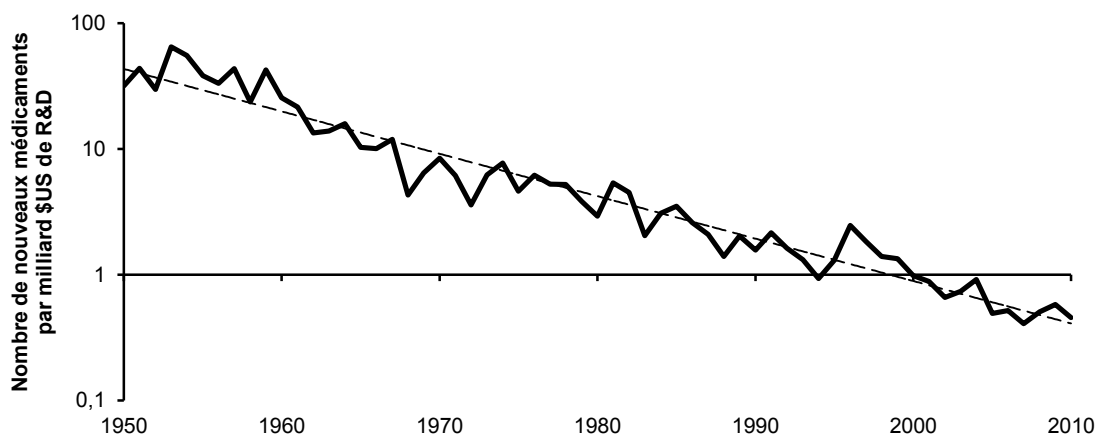


Figure 1. Nombre de médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis de 1950 à 2010 par milliard de dollars US dépensé dans la recherche et le développement, en dollars constants de 2008 (Scannell et al., 2012).

Si plusieurs autres facteurs peuvent expliquer cette tendance, des critiques ont été formulées quant à l'approche de recherche utilisée depuis les années 1990. Celle-ci, baptisée criblage à haut débit, repose sur la chimie combinatoire, qui consiste à construire des bibliothèques moléculaires par synthèse rapide et idéalement automatisée, puis à tester celles-ci sur des cibles biologiques très spécifiques en série. Cette méthode est très rapide et coûte moins cher par produit testé que d'autres approches, mais ses résultats sont mitigés (Carter, 2011). Elle tend à limiter le nombre de structures chimiques testées en fonction des possibilités d'automatisation et de la disponibilité des réactifs et réactions, d'autant qu'il existe une pression pour optimiser à l'avance les paramètres pharmacocinétiques des composés. De plus, la transposition de résultats semblant prometteurs sur une cible biologique unique à un milieu *in vivo* est souvent un échec (Scannell et al., 2012). En conséquence, malgré la concentration des efforts de recherche vers le criblage à haut débit, près de la moitié des médicaments approuvés entre 1994 et 2008 étaient plutôt inspirés des produits naturels et de leurs dérivés (Harvey, 2008). Pourtant, les produits naturels sont négligés depuis près de 30 ans par l'industrie pharmaceutique (Carter, 2011).

Les chercheurs recommencent donc à se tourner vers la nature pour trouver des molécules susceptibles de fournir les médicaments de demain (Harvey, 2008). Les produits naturels offrent une diversité structurale beaucoup plus vaste qu'une approche purement synthétique (Fabricant and Farnsworth, 2001; Harvey, 2008). En outre, le potentiel de découverte y est très étendu. Dans le seul domaine végétal, des 250 000 espèces de plantes vasculaires pouvant être présentes sur Terre, pas plus de 15 % n'ont fait l'objet d'études phytochimiques (Fabricant and Farnsworth, 2001).

L'étude des produits naturels bioactifs suppose en général le recours à des tests d'activité biologique phénotypiques. Ils consistent à étudier l'effet recherché sur des cellules ou un organisme entier plutôt qu'une seule cible biologique, et donnent donc en général une meilleure idée de l'effet du composé ou du mélange de composés *in vivo* (Carter, 2011; Harvey, 2008). Les essais phénotypiques ont permis de trouver davantage de médicaments approuvés que l'approche par cible moléculaire spécifique entre 1999 et 2008 (Scannell et al., 2012). Bref, bien que le processus soit plus long, le fractionnement bioguidé par des tests phénotypiques de mélanges de produits naturels offre de meilleurs gages de succès dans la découverte de composés prometteurs pour l'élaboration de médicaments que le criblage haut débit.

Devant le grand nombre de possibilités de recherches pour les seules plantes (nonobstant les microorganismes terrestres, les champignons et les produits marins), il faut toutefois trouver une manière de prioriser les études. L'ethnobotanique permet de faire l'inventaire des usages ancestraux des plantes, ce qui fournit un indice des végétaux à analyser en regard d'une maladie donnée. Une utilisation prolongée chez l'homme réduit également le risque que les composés présents dans une plante s'avèrent dangereusement toxiques. (Fabricant and Farnsworth, 2001).

Une fois un composé naturel isolé et caractérisé, il est possible d'entamer un travail d'hémisynthèse permettant d'améliorer ses paramètres pharmacocinétiques, sa puissance ou sa sélectivité (Carter, 2011; Fabricant and Farnsworth, 2001). Ceci réduit considérablement le nombre de composés nécessaires pour identifier une tête de série prometteuse et mène souvent à des structures moléculaires plus originales que ce qui est possible avec la chimie combinatoire actuellement (Scannell et al., 2012).

Le laboratoire LASEVE utilise donc des informations ethnobotaniques, les tests phénotypiques, l'extraction, la séparation et la caractérisation de produits naturels et l'hémisynthèse pour identifier des composés candidats au développement de médicaments, ou têtes de séries. Il travaille plus particulièrement sur la valorisation des espèces végétales endémiques du Québec. Les cancers du poumon et du côlon, particulièrement meurtriers et difficiles à traiter, sont parmi les principales cibles des recherches.

Le présent projet s'inscrit dans cette optique. Il consiste à étudier le potentiel anticancéreux de *Dirca palustris*, ou dirca des marais. Ce dernier est un arbuste endémique de l'est de l'Amérique du Nord, poussant dans les sous-bois d'érables. Il a été utilisé contre le cancer par les Amérindiens (Hartwell, 1982; Marie-Victorin, 2002), mais n'a jamais fait l'objet d'une étude scientifique à ce sujet. Un seul groupe de recherche s'est intéressé à la phytochimie de l'espèce auparavant, en isolant quatre glycosides de flavonoïdes, trois triglycérides et un glycoside de phénol simple (Ramsewak et al., 2001, 1999).

Chez l'espèce voisine, *D. occidentalis*, plusieurs composés fortement cytotoxiques ont été identifiés (Badawi et al., 1983). Enfin, la famille des Thyméléacées, à laquelle appartient le genre *Dirca*, est reconnue pour produire des diterpènes aux activités biologiques fortes et variées, dont des effets cytotoxiques (Borris et al., 1988; Liao et al., 2009). Le dirca des marais est donc un candidat pour une étude phytochimique bioguidée pouvant mener à l'isolation de composés cytotoxiques d'intérêt.

Objectif général

Identifier et caractériser un ou des composés responsables de l'activité cytotoxique d'un extrait bioactif de *Dirca palustris* Linné.

Objectifs spécifiques

- Extraire les composés bioactifs de la plante et procéder à un fractionnement bioguidé de l'extrait;
- Isoler et caractériser des composés responsables de l'activité biologique de l'extrait;
- Effectuer la synthèse totale de certains produits naturels identifiés dans la plante pour établir une relation structure-activité

Division du mémoire

Le second chapitre de ce mémoire sera consacré à une revue de littérature. Elle traitera d'abord du dirca des marais quant à ses caractéristiques botaniques et écologiques. Ses utilisations traditionnelles par les Amérindiens et sa toxicité seront passées en revue. Les molécules identifiées à ce jour dans le genre *Dirca* seront également présentées. La seconde partie du chapitre se concentrera sur une revue des stratégies considérées pour la partie synthétique du projet.

Le chapitre III présente un article qui sera soumis à *Organic Letters* et qui traite de quelques-unes des molécules isolées dans le cadre du projet de recherche. Les chapitres IV et V présentent

le reste des résultats obtenus, respectivement les autres composés isolés ainsi que leur caractérisation et la progression du volet synthétique du projet. Le sixième chapitre sera pour sa part consacré aux conclusions découlant de ce projet ainsi qu'aux perspectives d'avenir qui y sont liées.

Enfin, l'annexe I présente des réflexions sur la biosynthèse de certains composés isolés, alors que l'annexe II, préparée par Xavier St-Gelais, s'intéresse à l'étymologie du nom vernaculaire « bois de plomb » de *Dirca palustris*.

CHAPITRE II

REVUE DE LA LITTÉRATURE

A. Le dirca des marais

Les Thymelaeaceae

La famille des Thymelaeaceae (Juss.) comprend environ 500 espèces d'arbres et arbustes généralement toxiques. Elle est répartie dans toutes les régions tempérées et tropicales de la planète. On reconnaît la famille aux fleurs tubulaires essentiellement sépalaires de ses membres (van der Bank et al., 2002). Les genres de cette famille comptant le plus d'espèces sont *Daphne* (90 espèces), *Daphnopsis* (73 espèces), *Gnidia* (152 espèces), *Gonystylus* (32 espèces), *Pimelea* (80 espèces), *Thymelaea* (27 espèces) et *Wikstroemia* (87 espèces) (The Plant List, 2010).

Les Thymelaeaceae sont toxiques, tant pour l'homme que l'animal. De nombreuses espèces de ruminants sont exposées à ces plantes dans les pâturages (Tableau 1) (Borris et al., 1988). L'ingestion cause parfois la mort, et provoque à tout le moins des malaises gastriques majeurs. Le contact avec la peau entraîne pour sa part des symptômes inflammatoires sévères.

La famille des Thymelaeaceae est chimiquement proche de celle des Euphorbiaceae. On y retrouve des esters de diterpènes de type tigliane (p. ex. le phorbol, **1**) et daphnane (p. ex. la daphnétoxine, **2**) (Figure 2). Ces derniers sont toujours porteurs d'une fonction orthoester ou ester (He et al., 2002). Plusieurs daphnanes sont également macrocycliques, la chaîne alkyle de l'orthoester étant liée au cycle A à cinq membres (p. ex. la kirkinine B, **3**). Ces diterpènes sont en bonne partie responsables des activités biologiques, notamment pro-inflammatoires et pro- ou antitumorales, observées chez ces familles (He et al., 2002; Hecker, 1977; Liao et al., 2009).

Tableau 1. Toxicités répertoriées des Thymelaeaceae (tiré de Borris et al., 1988).

Effet toxique	Espèces responsables
Irritation respiratoire	<i>Arthrosolen polycephalus</i> , <i>Lasiosiphon anthylloides</i> , <i>Lasiosiphon burchellii</i> , <i>Pimelea curviflora</i>
Nausée et/ou vomissements	<i>Arthrosolen polycephalus</i> , <i>Dicranolepis persei</i> , <i>Dirca palustris</i> , <i>Pimelea dichotoma</i> , <i>Pimelea flava</i> , <i>Wikstroemia indica</i>
Dermatite, vésication	<i>Daphne</i> sp., <i>Dirca palustris</i> , <i>Gnidia</i> sp., <i>Gonystylus affinis</i> , <i>Gonystylus bacanus</i> , <i>Pimelea trichostrachya</i>
Gastrite sévère, inflammation gastrique	<i>Arthrosolen polycephalus</i> , <i>Daphne mezereum</i> , <i>Pimelea curviflora</i> , <i>Pimelea microcephala</i> , <i>Pimelea pauciflora</i> , <i>Pimelea simplex</i>
Irritation	<i>Daphne mezereum</i> , <i>Daphnopsis gnidium</i> , <i>Daphnopsis oleoides</i> , <i>Gnidia burchellii</i> , <i>Gnidia chrysantha</i> , <i>Lasiosiphon eriocephalus</i> , <i>Lasiosiphon meissnerianus</i> , <i>Thymelaea tartonraira</i> , <i>Wikstroemia</i> sp.
Toxicité systémique	<i>Daphne gnidium</i> , <i>Daphne laureola</i> , <i>Daphne mezereum</i>
Maux de tête	<i>Arthrosolen polycephalus</i>
Dépresseur du système nerveux central	<i>Arthrosolen polycephalus</i>
Mort chez l'homme	<i>Daphne mezereum</i>
Douleurs et convulsions	<i>Daphne mezereum</i>
Diarrhée	<i>Dicranolepis persei</i> , <i>Dirca palustris</i> , <i>Pimelea dichotoma</i> , <i>Pimelea flava</i> , <i>Pimelea microcephala</i>
Carences minérales	<i>Englerodaphne ovalifolia</i>
Attaque des muqueuses	<i>Funifera</i> sp.
Hémorragie	<i>Pimelea curviflora</i>
Tétanos	<i>Pimelea curviflora</i> , <i>Pimelea microcephala</i>
Congestion	<i>Pimelea linifolia</i>

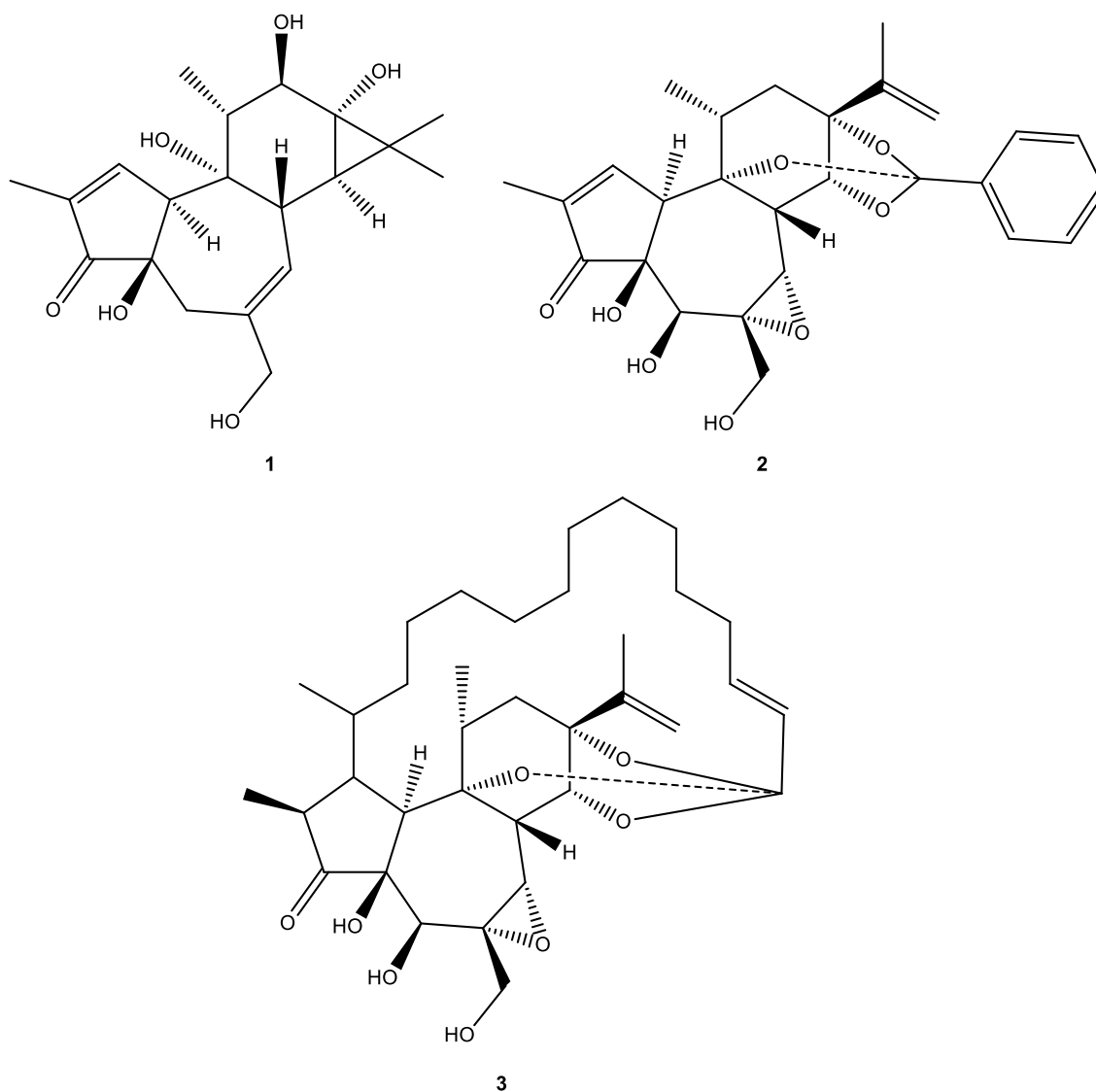


Figure 2. Composés typiques des diterpènes de type tigliane (phorbol, **1**) et daphnane (daphnétoxine, **2**). Ces derniers peuvent être macrocycliques (kirkinine B, **3**).

Les Thymelaeaceae sont également connues pour leur contenu en coumarines, dont certaines sont des dimères. L'exemple le mieux connu est la daphnorétine (**4**, Figure 3), qui possède une activité anticancéreuse (Cordell, 1984; Hussain et al., 2012; Li et al., 2004). Plusieurs

autres coumarines, dicoumarines et glycosides de coumarines ont été rapportés dans la famille (p. ex. Franke et al., 2002; Hu et al., 2009; Hussain et al., 2012; lang et al., 2002; Su et al., 2007).

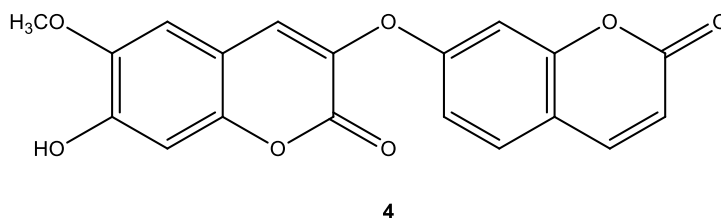


Figure 3. Structure de la daphnorétine, une bicoumarine commune chez les Thymelaeaceae.

Le genre *Dirca*

Les *Dirca* tiennent leur nom de Dircé, une femme de la mythologie grecque. Elle mourut en ayant été attachée à un taureau sauvage qui la traîna sur des rochers. Le dieu Dionysos, la prenant en pitié, aurait alors fait jaillir une source d'eau portant son nom près de Thèbes. Le genre est endémique de l'Amérique du Nord. Il ne comporte que quatre espèces connues à ce jour : *D. mexicana* G.L. Nesom & Mayfield, *D. decipiens* Floden, *D. occidentalis* A. Gray et *D. palustris* L.

D. mexicana et *D. decipiens* sont des espèces peu répandues, présentes au Mexique pour la première et au Kansas et en Arkansas pour la seconde. Elles n'ont été découvertes que tout récemment, en 1995 et en 2009 respectivement (Floden et al., 2009; Nesom and Mayfield, 1995). Leurs populations connues sont restreintes et les connaissances à leur sujet sont limitées.

C'est en Californie que l'on retrouve *D. occidentalis*, aussi appelé « western leatherwood » (Badawi et al., 1983). La distribution de cette espèce est également restreinte, puisqu'elle n'est

présente que dans quelques comtés autour de la baie de San Francisco (Abrams and Ferris, 1951; United States Department of Agriculture, 2014).

*L'espèce *Dirca palustris* Linné*

Noms

Le dirca des marais est l'espèce la plus anciennement connue de son genre, et de loin la plus répandue. Le nom du genre, à l'origine exclusivement réservé au dirca des marais, fait référence à une fontaine en raison de la préférence de l'espèce pour les sols humides. L'épithète spécifique *palustris*, littéralement « des marais », a été choisi en vertu de la même caractéristique.

Les anglophones appellent cet arbuste « leatherwood » ou « eastern leatherwood ». Ce nom viendrait de l'utilisation de l'écorce de dirca comme courroie ou corde par les Amérindiens (Marie-Victorin, 2002). Chez les colons français nord-américains et leurs descendants, l'usage a consacré la dénomination « bois de plomb », dont l'origine est expliquée différemment selon les auteurs (voir l'Annexe II pour une hypothèse étymologique unificatrice). Les Amérindiens des Appalaches l'appelaient pour leur part « wicopy » (Core, 1967).

Distribution et habitat

Le dirca des marais se trouve sur toute la moitié est de l'Amérique du Nord, à l'exception de Terre-Neuve-et-Labrador (Peterson and Graves, 2011; United States Department of Agriculture, 2012). La littérature indique que la plante ne pousse pas au nord de la ville de Québec (Marie-Victorin, 2002). On a cependant observé au moins une colonie à la réserve écologique de

Couchepeganish, au Lac-Saint-Jean (Gagnon et al., 1985) (Figure 4). Au sein de sa zone de distribution, le dirca des marais forme des populations plus denses et abondantes au nord qu'au sud (Peterson and Graves, 2011).

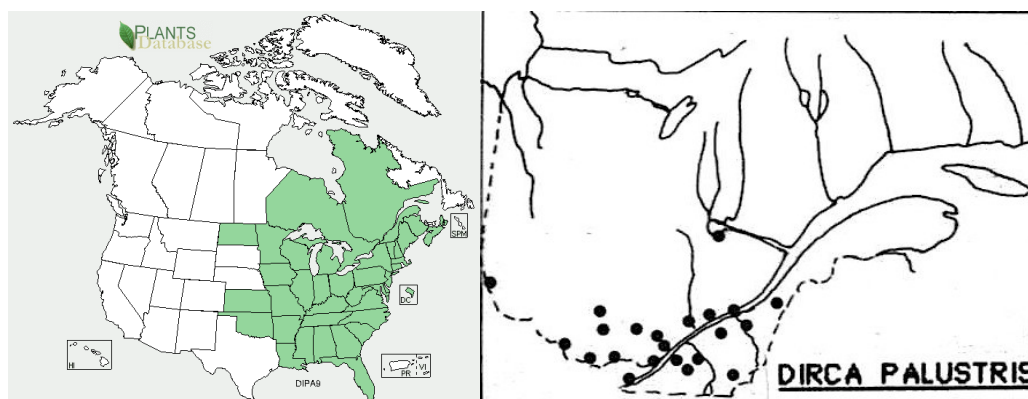


Figure 4. Gauche : provinces et États où l'on retrouve *Dirca palustris* L. (United States Department of Agriculture, 2012). Droite : distribution de *D. palustris* au Québec (Gagnon et al., 1985).

Il s'agit d'un arbuste sciaphile poussant généralement dans les sous-bois d'érables (Figure 5), y compris après sinistre naturel. L'aménagement humain des sites le fait disparaître à la faveur d'espèces moins tolérantes à l'ombre (Marie-Victorin, 2002; Palik and Kastendick, 2009). Le dirca pousse en petits groupes dispersés au sein desquels il est abondant, séparés par des zones où il est absent (Peterson and Graves, 2011). Il apprécie les sols humides à tendance marécageuse ou les terres riches en bordure de cours d'eau (Bigelow, 1818; Williams, 2004). On peut parfois observer des centaines d'individus par hectare dans les peuplements les plus denses (Peterson and Graves, 2011). Au Québec, on a rapporté jusqu'à 20 kg de biomasse de dirca par hectare en Beauce (Tremblay and Larocque, 2001). Il aurait une croissance lente et une espérance de vie de plusieurs décennies (Williams, 2004).



Figure 5. Dirca des marais dans son habitat, en sous-bois d'érable mature, accompagné ici de l'if du Canada. Photo : Myriam Gauthier.

Caractéristiques botaniques

Linné décrivait l'espèce ainsi : Thyméléa à fleurs blanches sortant au début du printemps, à feuilles oblongues et à brindilles et écorce très fortes. (Traduction libre du latin)

Cette description, bien que condensée, souligne bien deux propriétés distinctives du dirca des marais, à savoir la précocité de sa floraison et la résistance de son écorce. Plus spécifiquement, *Dirca palustris* L. est un arbuste de 1 à 3,3 mètres de haut (Gray and Fernald, 1970), à branches nombreuses et de tendance horizontale, de forme générale irrégulière (Bigelow,

1818; Gray and Fernald, 1970). Le bois, blanc et mou, se brise facilement (Gray and Fernald, 1970; Marie-Victorin, 2002). À l'inverse, l'écorce fibreuse est extrêmement robuste et difficile à rompre sans un outil coupant (Bigelow, 1818; Erichsen-Brown, 1979; Gray and Fernald, 1970; Marie-Victorin, 2002). Elle se pèle aisément en longues lanières et est de teinte grise à orangée (Erichsen-Brown, 1979). Sur les jeunes branches, elle présente des « joints » qui séparent les segments de croissance de chaque année (Bigelow, 1818; Gleason and Cronquist, 1993; Peterson and Graves, 2011) (Figure 6, D). Les racines sont souvent recourbées, ne formant généralement pas de pivot, et sont plus pâles que les tiges (Figure 6, B).

Les feuilles sont simples, minces, généralement alternes, de forme ovale-obovée, subacuminées, mesurant de 5 à 8 cm de long (Bigelow, 1818; Gleason and Cronquist, 1993; Gray and Fernald, 1970; Marie-Victorin, 2002) (Figure 6, A). Les pétioles sont courts, de 2 à 5 mm de long (Gleason and Cronquist, 1993), et on trouve des bourgeons à leur base (Gray and Fernald, 1970). Les feuilles sont pubescentes lorsqu'elles sont jeunes pour devenir glabres et membraneuses avec le temps, et sont plus pâles sur la face inférieure (Bigelow, 1818; Erichsen-Brown, 1979; Marie-Victorin, 2002).

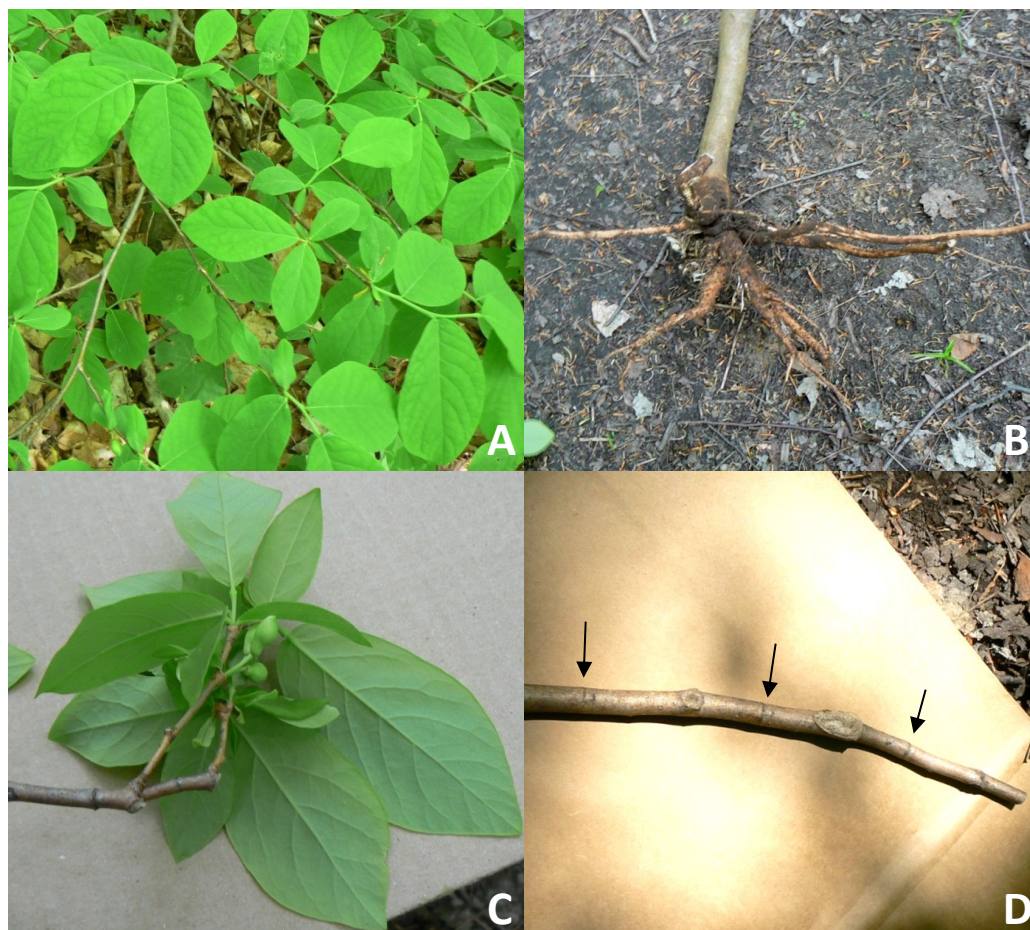


Figure 6. Détails anatomiques du dirca des marais. A : Feuilles et brindilles. Les tiges de l'année sont encore vertes, non lignifiées. B : Insertion des racines superficielles. C : Fruits, par grappes d'un à trois, d'une forme rappelant un citron. D : Détail de l'aspect segmenté des branches. Photos : Myriam Gauthier et personnelles.

Les fleurs jaunes du dirca sont parfaites et tétramères (Gleason and Cronquist, 1993). Elles apparaissent 7 à 10 jours avant les feuilles (et plusieurs semaines avant le feuillage forestier) par racèmes axillaires subsessiles de 2 à 4 (Gleason and Cronquist, 1993; Williams, 2004). Elles émergent d'un bourgeon écailleux et pubescent au bout de chaque branche fleurie (Erichsen-Brown, 1979), qui forme également un involucre d'où sort la branche de la nouvelle année (Bigelow, 1818; Gray and Fernald, 1970). Le périanthe tubulaire resserré à la base et légèrement élargi à la marge est muni de quatre petites pointes (Bigelow, 1818; Gleason and Cronquist, 1993;

Gray and Fernald, 1970). La distinction entre sépales et pétales ou corolle et calice est variable selon les auteurs.

Les fleurs mesurent de 7 à 10 mm de long et sont dotées de 8 étamines exsertes dépassant la marge du périanthe de 3 mm environ (Gleason and Cronquist, 1993; Marie-Victorin, 2002; Williams, 2004). L'anthère est ronde (Bigelow, 1818). Les étamines sont insérées au-dessus du milieu du périanthe en deux verticilles alternes (Bigelow, 1818; Gray and Fernald, 1970; Marie-Victorin, 2002; Williams, 2004). Le style filiforme courbé est plus long encore que les étamines (Bigelow, 1818; Gleason and Cronquist, 1993; Gray and Fernald, 1970). L'ovaire, subsessile, porte un ovule simple, anatrope (Marie-Victorin, 2002; Williams, 2004).

Le fruit est une drupe ellipsoïde ou ovoïde-oblongue acuminée de 8 à 15 mm de long (Bigelow, 1818; Gray and Fernald, 1970; Marie-Victorin, 2002; Ramsewak et al., 2001; Williams, 2004) (Figure 6, C). Il est de vert, jaune ou rouge (Erichsen-Brown, 1979; Gray and Fernald, 1970; Williams, 2004). Il porte une seule graine noirâtre (Bigelow, 1818; Williams, 2004).

La reproduction du *dirca* semble essentiellement sexuelle. La propagation clonale, bien que rapportée, n'est pas dominante (Peterson and Graves, 2011). La plante est probablement autogame facultative puisque la fécondation a lieu malgré la faible présence d'insectes pollinisateurs au moment de la floraison très hâtive (Williams, 2004). Les graines tombent au pied du plant parent et pourraient être dispersées par des rongeurs frugivores, mais demeurent le plus souvent sur place (Peterson and Graves, 2011; Williams, 2004). Cela pourrait expliquer la tendance de l'espèce à pousser en groupes denses nettement séparés.

Au sein des Thymelaeaceae, le dirca des marais appartient à la sous-famille des Thymelaeoideae (van der Bank et al., 2002).

Propriétés et utilisations

La résistance de l'écorce du dirca des marais est remarquable. Elle servait à la confection de courroies, de cordes, de ficelles, de paniers, d'attaches ou de sandales chez les Amérindiens de tout le nord-est américain (Core, 1967; Erichsen-Brown, 1979; Moerman, 1998). On l'employait de manière similaire chez les colons et leurs descendants, par exemple pour réparer des chaises tressées, comme lien pour fabriquer des traîneaux ou pour nouer des sacs (Erichsen-Brown, 1979; Marie-Victorin, 2002).

Le dirca peut également faire office de plante ornementale, surtout pour sa floraison hâtive. Il a déjà été cultivé quelques années dans les jardins royaux de France, au 18^e siècle (Duhamel du Monceau, 1755). Cet usage se serait occasionnellement répété par la suite en Europe (Du Mont de Courset, 1811). On le retrouve parfois dans les aménagements paysagers nord-américains modernes (Davis, 2009; Webster, 2004).

Les différentes Premières Nations de l'Est faisaient un usage médicinal varié du dirca des marais (Tableau 2). Cependant, c'est son utilisation contre le cancer qui retient particulièrement l'attention. Des Amérindiens auraient appris à un certain abbé Gendron à se servir de l'écorce pour traiter cette maladie au 17^e ou 18^e siècle (Erichsen-Brown, 1979; Marie-Victorin, 2002). Jonathan Hartwell a inclus le dirca des marais dans son livre listant les plantes traditionnellement utilisées contre le cancer en Amérique du Nord (Hartwell, 1982).

Tableau 2. Utilisations médicinales traditionnelles du dirca des marais par les Amérindiens

Partie de la plante	Usage	Nations	Forme	
Écorce	Laxatif ^a	Algonquins	Infusion	
		Iroquois	Décoction, infusion	
	Cathartique ^a	Iroquois	Entier	
	Diurétique ^{a, b}	Ojibwés, Potawatomi	Infusion	
Écorce+racine	Analgésique ^{a, b}	Iroquois	Infusion, cataplasme	
	Anticancer ^b	Non précisé	Bouillie entière	
	Fertilité féminine ^a	Iroquois	Décoction	
	Problèmes rénaux ^a	Iroquois	Infusion	
Écorce+bois	Émétique ^{a, b}	Iroquois	Infusion	
Tiges (de fruits? Stalk)	Cathartique ^a	Chippewa	Infusion, entier	
Tiges	Aphrodisiaque ^{a, c}	Iroquois	Décoction	
	Fortifiant ^{a, c}	Iroquois	Décoction	
Branches et brindilles	Enflures superficielles ^{a, c}	Iroquois	Décoction en cataplasme	
	Infections urinaires ^a	Ojibwés	Infusion	
Bois	Cathartique ^a	Iroquois	Entier	
	Fortificateur des cheveux ^a	Chippewa	Décoction en shampooing	
Racine	Problèmes pulmonaires ^a	Chippewa	Infusion	
	Purification du sang ^{a, c}	Iroquois	Décoction ou infusion	
	Inflammations internes ^{a, c}	Iroquois	Entier	
	Analgésique ^a	Iroquois	Infusion	
	Fièvre typhoïde, gonorrhée, syphilis ^{a, c}	Iroquois	Infusion ou macérat	
	Tonique ^a	Iroquois	Décoction	
	Diurétique ^a	Menominee	Infusion	
	Problèmes rénaux ^b	Menominee	Infusion	
	Antidiabétique ^d	Iroquois, Ojibwés	N. D.	
	Maux de dos ^c	Iroquois	Macérat	
	Laxatif ^c	Iroquois	Décoction	
	Mélange de parties	Cernes des yeux, plaies au cou ^a	Iroquois	Infusion
		Tuberculose ^{a, c}	Iroquois	Entière

^a(Moerman, 1998) ^b(Erichsen-Brown, 1979) ^c(Herrick and Snow, 1995) ^d(McCune and Johns, 2007)

Comme la plupart des Thyméléacées, le dirca des marais est toxique. La consommation de l'écorce par voie orale provoque une sensation d'âcreté au palais. Il s'ensuit une salivation importante, un malaise gastrique, des nausées et le vomissement (Bigelow, 1818; Erichsen-Brown, 1979; Lampe and Fagerström, 1968; Remington and Woods, 1918).

L'écorce est également fortement laxative et purgative. Au Québec, les acériculteurs détectaient les voleurs de sirop avec de l'écorce de dirca. L'ajout de celle-ci au liquide sucré provoquait un malaise important chez les coupables en consommant (Marie-Victorin, 2002). Appliquée sur la peau, l'écorce possède une activité rubéfiante puis vésicante sévère (Bigelow, 1818; Erichsen-Brown, 1979; Lampe and Fagerström, 1968; Marie-Victorin, 2002; Remington and Woods, 1918).

La consommation des fruits provoquerait de la stupeur, une dilatation des pupilles, de l'insensibilité, de la nausée et de la faiblesse (Bigelow, 1818; Remington and Woods, 1918). Les racines produisent pour leur part un effet soit émétique soit purgatif, selon la dose (Bigelow, 1818; Erichsen-Brown, 1979). Des biologistes du Michigan ont finalement observé que les herbivores forestiers évitaient de consommer le dirca (Ramsewak et al., 2001).

Phytochimie et bioactivité des dirca

Un seul groupe de recherche (Bioactive Natural Products and Phytoceuticals du Michigan State University) s'est précédemment intéressé à la phytochimie du dirca des marais. L'étude des graines a permis d'isoler trois triglycérides (**5-7**) (Figure 7) ainsi que les acides oléiques et

linoléiques. Ces deux acides montraient une activité insecticide sur plusieurs espèces (Ramsewak et al., 2001).

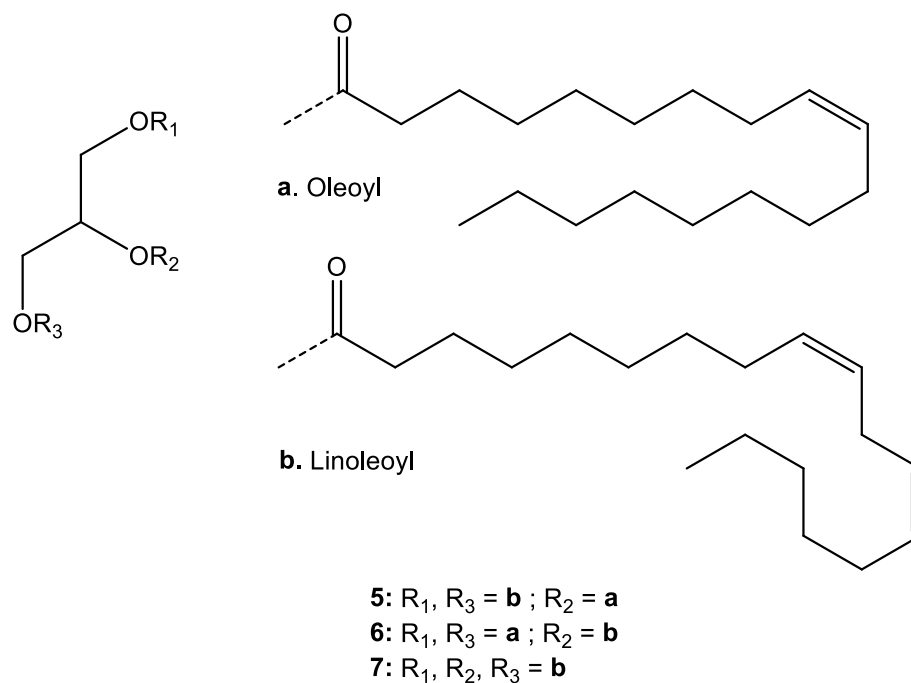


Figure 7. Triglycérides isolés des graines du dirca des marais (Ramsewak et al., 2001).

La purification des extraits des rameaux a pour sa part permis d'obtenir cinq glycosides phénoliques précédemment inconnus (**8-12**) (Figure 8). Des tests antioxydants sur liposomes ont démontré une activité modérée pour les composés **8-11**, tandis que les composés **11** et **12** ont faiblement inhibé la COX-I dans un test anti-inflammatoire, sans avoir d'effet sur la COX-II (Ramsewak et al., 1999).

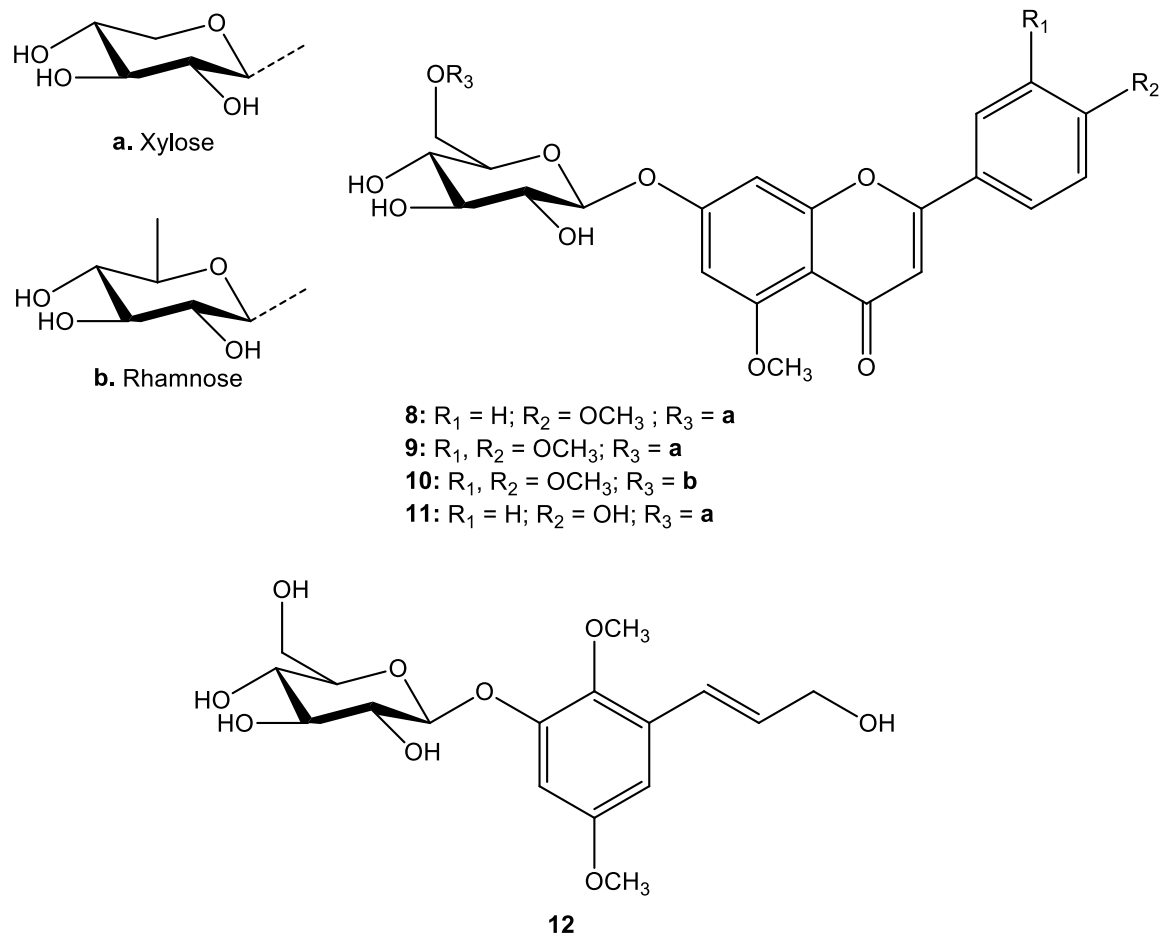


Figure 8. Glycosides phénoliques des brindilles du dirca des marais (Ramsewak et al., 1999).

Aucune recherche n'a jusqu'à présent été effectuée afin d'étudier chimiquement la toxicité rapportée du dirca des marais ou ses effets médicinaux traditionnels. C'est plutôt chez *D. occidentalis* que certains chercheurs (Badawi et al., 1983; Suh et al., 1995) ont identifié des composés antileucémiques (Figure 9). Une première extraction sur les rameaux et les fleurs a permis d'obtenir des orthoesters de daphnanes (**13-14**), des lignanes (**15-17**) et la daphnorétine (**4**, Figure 3) (Badawi et al., 1983). Un autre groupe a également isolé d'un extrait de *D. occidentalis* (partie de la plante et type extrait non spécifiés) le lignane **17** sous forme (\pm), un flavonoïde (**18**) et un stérol à groupement glycolipidique (**19**) (Suh et al., 1995). *D. mexicana* et *D. decipiens* n'ont

pour leur part jamais été étudiés du point de vue de leur composition chimique et de leur activité biologique.

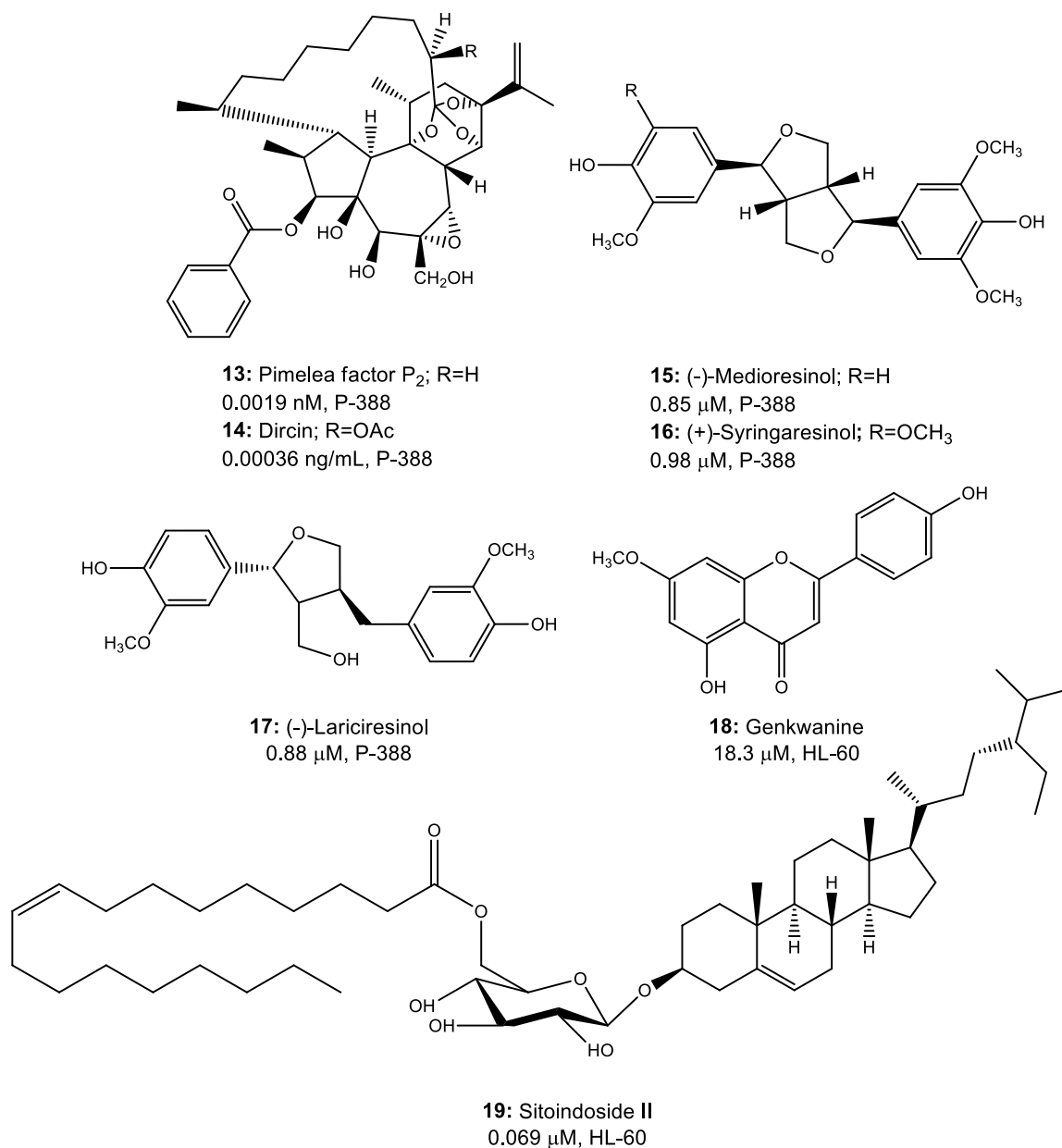


Figure 9. Composés antileucémiques isolés de *Dirca occidentalis*, avec leurs valeurs d'IC₅₀ et la lignée cellulaire testée (Badawi et al., 1983; Suh et al., 1995).

B. Synthèse

Les composés retenus pour une étude synthétique sont les dirchromones soufrées, possédant le squelette **20** (Figure 10; voir chapitre III). Leur structure est à la fois originale et relativement simple. Les dirchromones présentent des activités cytotoxiques et antibactériennes variables selon le motif de substitution.

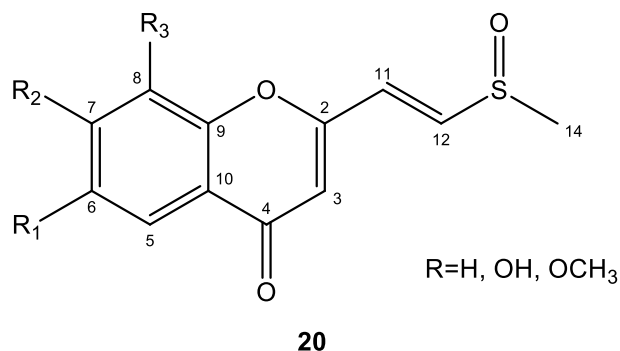


Figure 10. Squelette de base des dirchromones isolées de *Dirca palustris* L. (voir chapitre III)

La synthèse doit permettre d'obtenir différentes dirchromones mono ou disubstituées aux positions 5, 6, 7 et 8. L'obtention des combinaisons possibles avec des groupements hydroxy et méthoxy constituerait la base d'une étude structure-activité. Une analyse rétrosynthétique permet de dégager quatre grandes étapes de synthèse à partir de réactifs commerciaux :

- a) l'obtention d'une chromone 2-substituée modifiable par la suite;
- b) la synthèse de la chaîne soufrée;
- c) un couplage carbone-carbone permettant de réunir les parties obtenues en a) et en b);
- d) la substitution du cycle aromatique.

La substitution du noyau aromatique peut se faire avant ou après le couplage carbone-carbone. Il existe par ailleurs des voies synthétiques combinant ou éliminant des étapes, selon les réactifs de départ. La Figure 11 présente un aperçu des stratégies envisagées. Le détail de la préparation des réactifs soufrés et aromatiques est présenté tout au long de cette section.

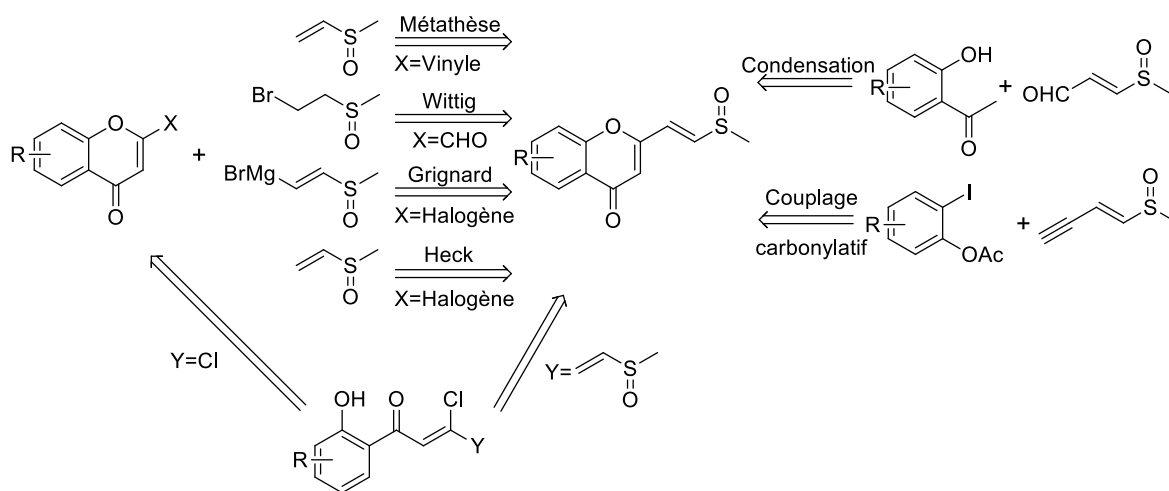


Figure 11. Principales stratégies de synthèse envisagées pour l'obtention des dirchromones.

Approches de couplage carbone-carbone

Plusieurs procédures courantes permettent de créer un lien carbone-carbone. Dans le cas présent, deux approches générales seraient possibles. Une première stratégie consisterait à greffer une chaîne alkyle en position 2 d'une chromone adéquate. Il faut alors maximiser l'obtention de l'isomère *trans*.

À cet égard, une première possibilité impliquerait d'effectuer un couplage de Heck à partir d'une 2-halogénochromone (**21**) et du méthylsulfinyléthène (**22**) (Figure 12). De nombreuses

conditions pour obtenir ce couplage ont été rapportées (Beletskaya and Cheprakov, 2000). Elles permettent entre autres d'obtenir une bonne sélectivité envers l'isomère *trans*.

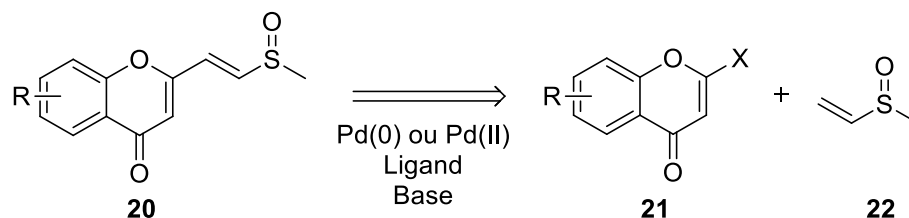


Figure 12. Couplage de Heck palladocatalytique.

Une autre manière d'obtenir la chaîne insaturée serait de la générer à l'aide d'une réaction de Wittig, couramment employée à cette fin (Maryanoff and Reitz, 1989) (Figure 13). Il faudrait dans ce cas combiner l'aldéhyde **23** à l'ylure **24**, en modulant les conditions pour maximiser la synthèse de l'isomère *trans*. Le composé **23** pourrait être obtenu à partir de l'acide **25** offert commercialement, après avoir réduit la fonction en aldéhyde dans des conditions douces (J. S. Cha et al., 1987; Jin Soon Cha et al., 1987; Choi and Yoon, 1995). Quant à l'ylure **24**, il pourrait être formé à partir du bromométhylsulfinylméthane (**26**), un produit commercial. Cette méthode possède l'avantage d'être réalisable en peu d'étapes. Cependant, l'obtention d'une bonne sélectivité *cis/trans* pourrait représenter un défi.

On pourrait inverser les rôles de l'ylure et de l'aldéhyde. Dans ce cas, on oxyderait le sulfide **27** en sulfoxyde (Golchoubian and Hosseinpour, 2007) en générant l'aldéhyde du même coup pour obtenir le composé **28**. On pourrait ensuite réaliser le couplage avec l'ylure **29**, obtenu de l'halogénochromone **19**. Dans ce cas, le principal avantage du couplage de Wittig, soit la réduction

du nombre d'étapes, serait perdu. En effet, il faudrait préparer au préalable le composé **21**, comme pour un couplage de Heck.

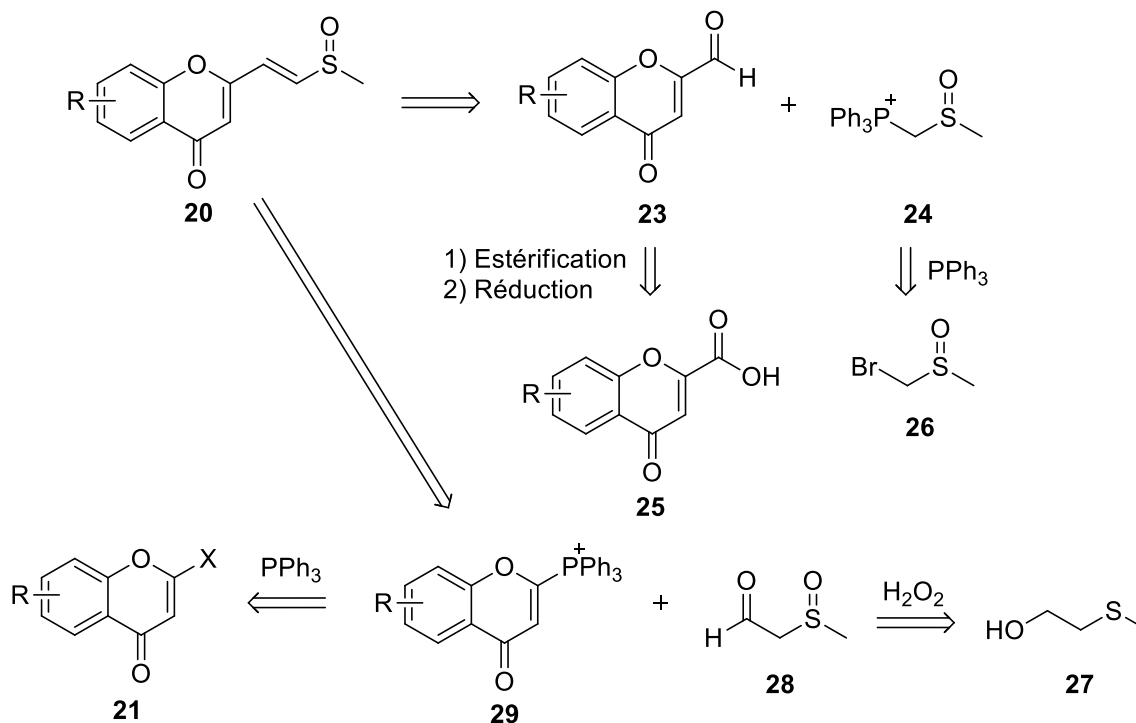


Figure 13. Couplages de Wittig possibles.

Une troisième approche aurait recours à la 2-vinyl-chromone **30**, qui n'est pas un produit commercial. Une métathèse croisée pourrait permettre d'y coupler le sulfoxyde **22** (Figure 14). Cette réaction fournirait toutefois un mélange d'isomères *cis/trans*, et probablement des produits d'homocouplage, ce qui rend cette approche moins intéressante (Schuster and Blechert, 1997).

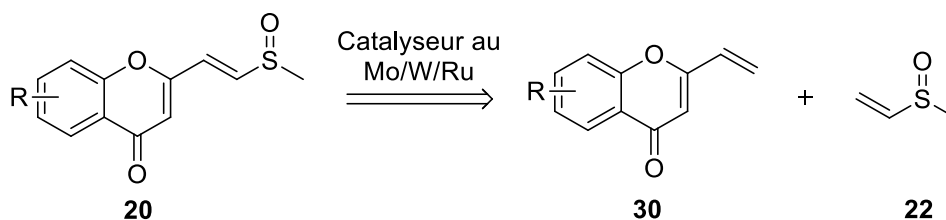


Figure 14. Métathèse croisée (Schuster and Blechert, 1997).

Les réactifs de Grignard permettent également de procéder à des couplages carbone-carbone dans de nombreuses circonstances. Pour pouvoir utiliser cette réaction dans la synthèse de la chromone finale (Figure 15), le vinyl devrait être présent sur l'un ou l'autre des deux fragments à coupler. Cela soulève la difficulté d'obtenir un halogénure anti-Markovnikov (voir plus bas). À partir d'un 1-halogéno-2-methylsulfinyléthène (**31**), on pourrait produire un organomagnésien et procéder à un couplage avec la 2-halogénochromone **21** en présence d'un catalyseur afin d'obtenir le produit désiré (Ramiandrasoa et al., 1997). Alternativement, on pourrait utiliser le réactif de Grignard pour générer la fonction soufrée directement sur une chromone 2-alkylée **32**. L'organomagnésien pourrait alors être converti en sulfide **33** en réagissant avec du mercaptan en présence d'une base organique (Koval', 2007). Ce sulfide serait ensuite oxydé en sulfoxyde dans des conditions douces, en utilisant par exemple de l'acide iodique afin d'éviter la formation d'un sulfone (Shirini and Zolfigol, 2001). Dans les deux voies proposées, les réactifs de départ ne sont pas offerts dans le commerce et devraient être préparés au préalable, ce qui rendrait ces synthèses assez longues.

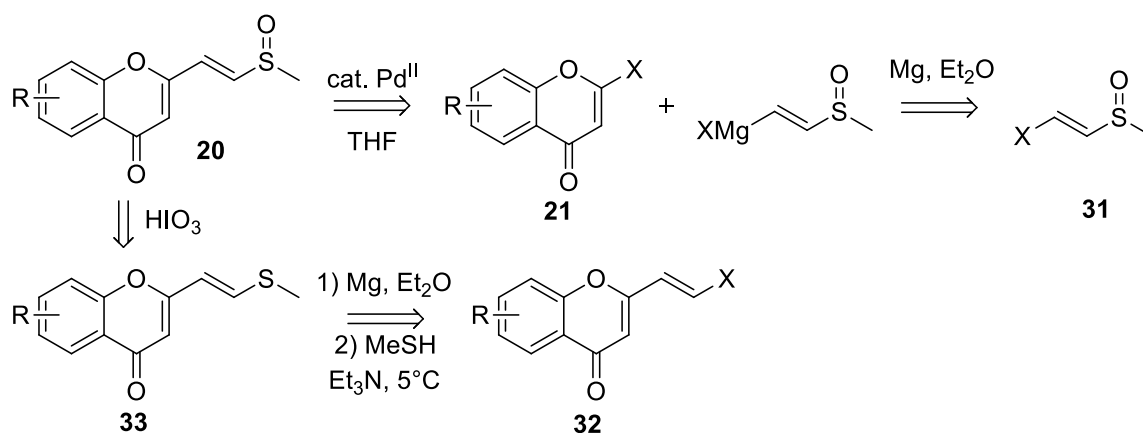


Figure 15. Voies de synthèse possibles avec les réactifs de Grignard.

Pour aborder le couplage carbone-carbone, l'autre manière de procéder s'inspire de la synthèse des flavonoïdes, en couplant un noyau aromatique à une chaîne fonctionnalisée pour ensuite former la chromone par cyclisation. Le lien carbone-carbone pourrait également être formé en même temps que l'hétérocycle oxygéné.

Par exemple, une condensation entre l'acétophénone ou un de ses dérivés (**34**) et l'aldéhyde **35** pourrait être réalisée en présence de base organique et d'un oxydant doux (Figure 16) (Oyama et al., 2011) ou de carbonate de calcium (Fridén-Saxin et al., 2009). Cette synthèse permettrait d'éviter plusieurs étapes, mais poserait le défi d'obtenir l'aldéhyde **35** (voir plus bas). Elle semble cependant assez robuste pour générer facilement plusieurs patrons de substitution sur le noyau aromatique.

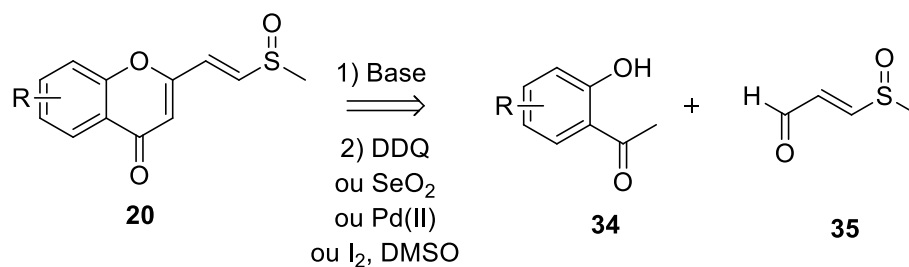


Figure 16. Condensation d'une acétophénone et d'un aldéhyde (Oyama et al., 2011).

Une autre manière de combiner la formation de la chromone et l'établissement d'un lien carbone-carbone est le couplage carbonylatif (Figure 17). En présence de monoxyde de carbone, un cycle aromatique comportant un acétate et un iodure tel que **36**, disponible dans le commerce, pourrait réagir avec l'alcyne terminal **37** pour former une chromone 2-alkylée (Oyama et al., 2011).

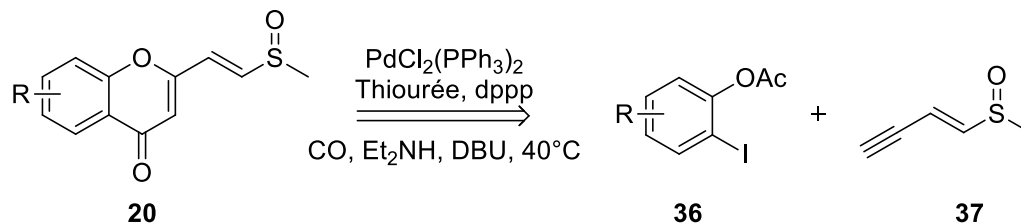


Figure 17. Couplage carbonylatif (Oyama et al., 2011).

Génération de la chromone

À partir des schémas rétrosynthétiques du couplage carbone-carbone, il est nécessaire d'envisager la synthèse des chromones **21**, **30** et **32**. Le précurseur **25** est pour sa part disponible sur le marché. Pour synthétiser les précurseurs manquants, on pourrait soit modifier des chromones existantes, soit en obtenir une en générant l'hétérocycle en cours de route.

Le composé **21** doit comporter un halogène ou un triflate ($-\text{SO}_2\text{CF}_3$) en position 2, selon les utilisations que l'on souhaite en faire. La 2-hydroxychromone serait un bon produit de départ théorique, mais est un tautomère d'un produit plus stable, la 4-hydroxycoumarine (**38**). Une étude par spectroscopie infrarouge a démontré l'absence du tautomère chromone dans le produit au repos (Obaseki et al., 1982). L'introduction directe d'un triflate via l'anhydride triflique sur la coumarine **38** ne peut donc produire que le composé **39** sans obtenir le produit voulu **21** avec $\text{X}=\text{OTf}$ (Pierson et al., 2010) (Figure 18).

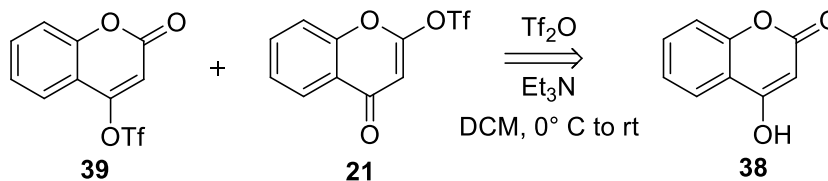


Figure 18. Obtention de triflates avec l'anhydride triflique. Le produit **21** n'est en réalité pas obtenu (Pierson et al., 2010).

Puisque la tautomérisation en cours de réaction est insuffisante pour obtenir une bonne quantité de 2-triflate-chromone, une seconde voie permettrait d'arriver à la 2-bromo-chromone à partir du même produit de départ (Figure 19). Il s'agirait d'abord de méthyler le composé **38** au diazométhane pour obtenir 20 % de 2-méthoxychromone (**40**), le reste de la méthylation se produisant sur la forme coumarine (Sulko, 2000). Puisqu'il faut convertir le méthoxy en hydroxy pour parvenir au bromure, une protection de la cétone en acétal **41** serait nécessaire, afin d'éviter la tautomérisation du composé en 4-hydroxycoumarine. Les acétals et les thioacétals sont envisageables pour cet usage, les seconds étant plus résistants. Un thioacétal peut être obtenu avec l'éthanedithiol en présence d'un acide de Lewis (Hatch et al., 1978; Wuts and Greene, 2007). L'utilisation du tandem $\text{BBr}_3 / \text{PBr}_3$ permettrait une déméthylation (McOmie et al., 1968) suivie de l'échange de l'hydroxy pour un bromure (**42**) (Harrison and Diehl, 1943). Si le groupement protecteur est un thioacétal, la déprotection pourrait alors se faire avec le chlorure de sulfuryl en présence d'un acide de Lewis doux, comme de la silice humidifiée (Hojo and Masuda, 1976), pour obtenir le produit **21** où l'halogène est un brome. Pour cette voie, l'étape la plus incertaine serait la conversion de l'alcool en bromure, car le mécanisme de réaction en $\text{S}_{\text{N}}2$ laisse croire que cette étape ne fonctionnera pas en pratique (Hunt, 2006).

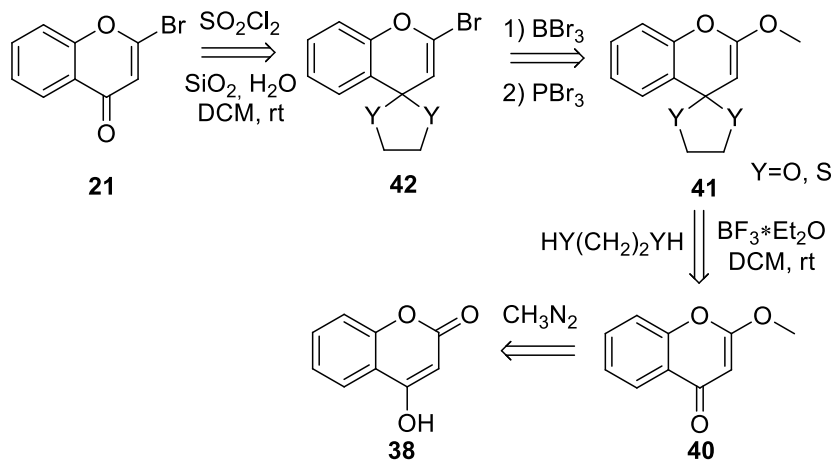


Figure 19. Obtention de la 2-bromochromone à partir de la 4-hydroxycoumarine.

Le composé **21** pourrait également être obtenu par cyclisation (Figure 20). D'abord, un dérivé chloré d'acide acrylique ou d'acroléine (**43**) serait transformé en chlorure d'acyle, puis couplé à un phénol pour obtenir l'ester **44**. En présence de chlorure d'aluminium, celui-ci subirait un réarrangement de Fries pour créer un nouveau lien carbone-carbone (**45**). En milieu basique, la chaîne se cycliserait sur l'hydroxy phénolique pour générer la chromone halogénée **21**, où $\text{X} = \text{Cl}$ (Levas and Levas, 1960). Selon la sélectivité de chaque étape, il serait théoriquement possible d'obtenir tous les dérivés mono et dihydroxylés de la dirchromone à partir de l'ensemble des dihydroxybenzènes et des trihydroxybenzènes.

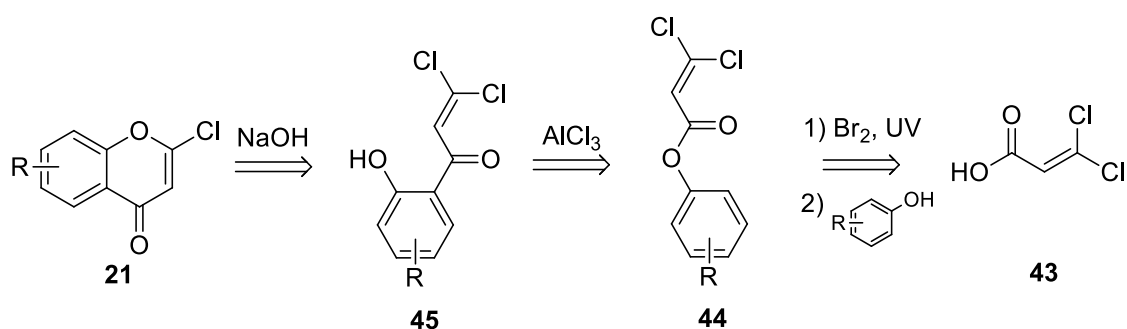


Figure 20. Synthèse de la 2-chlorochromone à partir d'un dérivé acrylique (Levas and Levas, 1960).

Une variante de cette méthode consisterait à réaliser le couplage de la chaîne soufrée avant de cycliser la chromone pour obtenir l'ester **46** (Figure 21). Cette méthode a toutefois le défaut d'offrir deux sites réactionnels potentiels (les deux chlores) au couplage au palladium, fournissant un mélange d'isomères *cis* et *trans* sur l'alcène en α - β du carbonyle.

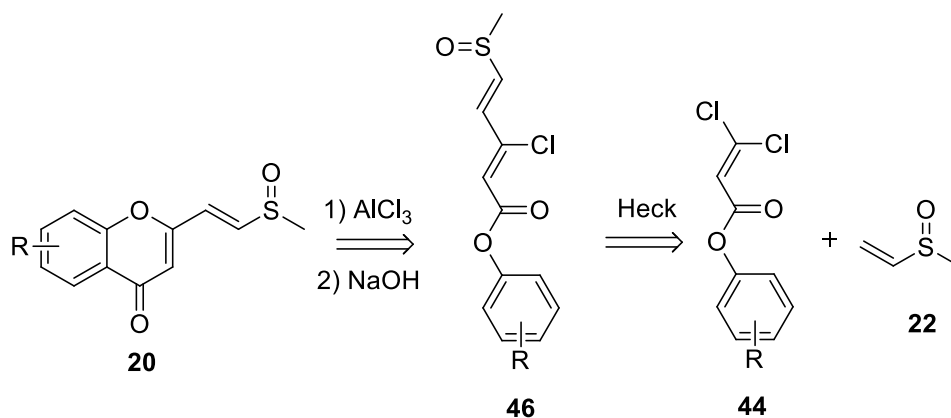


Figure 21. Couplage de la chaîne soufrée avant cyclisation de la chromone

La 2-vinylchromone **30**, nécessaire à la métathèse croisée, pourrait être obtenue de deux manières (Figure 22). Une première voie part de l'acide **25**, qui est méthylié puis réduit en alcool (Bruckner, 2001). Un couplage de Mitsunobu avec de l'acide cyanhydrique généré *in situ* permettrait d'allonger la chaîne d'un carbone sous forme de nitrile (Koizumi et al., 2010), fournissant le produit **47**. Une réduction avec le DIBAL permettrait d'obtenir l'aldéhyde (Bruckner, 2001), ensuite réduit en alcool, qui pourrait être déshydraté pour fournir l'alcène (Vollhardt and Schore, 2009). Alternativement, il serait possible d'utiliser l'halogénochromone **21** pour le couplage avec de l'éthanal (**48**) par une réaction de Wittig. Une dernière option passerait par le couplage du réactif de Grignard **49** sur la chromone. Dans ce cas, l'alcool obtenu devrait être déshydraté pour régénérer l'alcène.

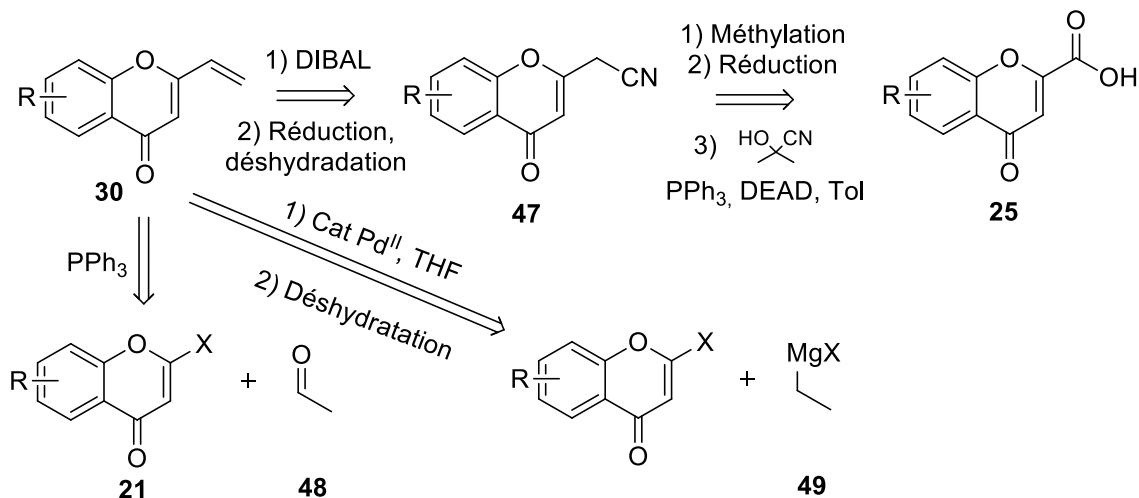


Figure 22. Voies d'obtention possible de la 2-vinylchromone.

Quant à l'halogénovinylchromone **32**, elle nécessiterait d'obtenir au préalable la vinylchromone **30**. L'obtention d'un halogénure anti-Markovnikov qui préserve la double liaison n'est pas simple. Une première méthode consisterait à réaliser une métathèse croisée entre le produit **30** et le dihalogénoéthène **50** (Figure 23). On garderait toutefois dans ce cas le problème de la sélectivité *cis/trans*, qui n'est pas contrôlée. Une seconde approche (A) consisterait à faire l'ozonolyse de l'alcène, puis à coupler *in situ* un ylure tiré du dichlorométhane à l'aldéhyde formé (Southern et al., 2008). Une troisième voie (B) reposerait sur la formation d'un alcyne, suivie d'une hydrostannation puis d'un couplage à l'iode, ce qui permettrait d'obtenir un iodure oléfinique terminal (Velvadapu et al., 2011). D'autres méthodes encore seraient possibles, mais toutes font appel à des conditions relativement exotiques (p. ex. Kikkawa et al., 1980; Rajanna et al., 2007).

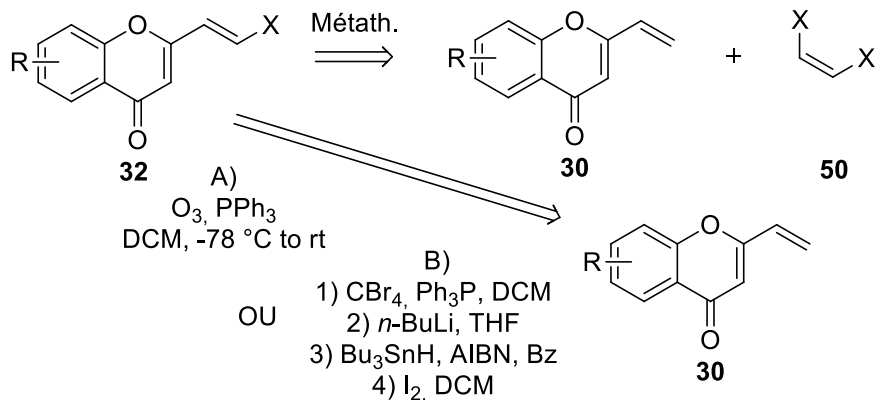


Figure 23. Obtention d'un halogénoalcène anti-Markovnikov.

Chaîne soufrée

En plus de la méthode de génération de sulfide via un Grignard vue plus haut, six composés soufrés distincts sont utilisés dans les rétrosynthèses pour obtenir la chromone finale. Si les composés **26** et **27** sont disponibles sur le marché, il est nécessaire de préparer les précurseurs **22**, **31**, **35** et **37**.

Le méthylsulfinyléthène (**22**) est intéressant tant pour les métathèses croisées que pour les couplages au palladium. Il existe trois méthodes relativement simples pour le préparer (Figure 24). Une première consisterait à faire un couplage entre un réactif de Grignard et le chlorure de sulfinyl **50** (Li and Liu, 2007), lui-même obtenu après oxydation et chloration presque quantitative du diméthyldisulfide commercial (**51**) (Youn and Herrmann, 1986). Une seconde voie viserait à oxyder le sulfide **27** en sulfoxide, en utilisant auparavant du KOH pour obtenir l'alcène par déshydratation plutôt que l'aldéhyde **28** (voir Figure 13) (Cubbage et al., 2001a; Zhang, 1991).

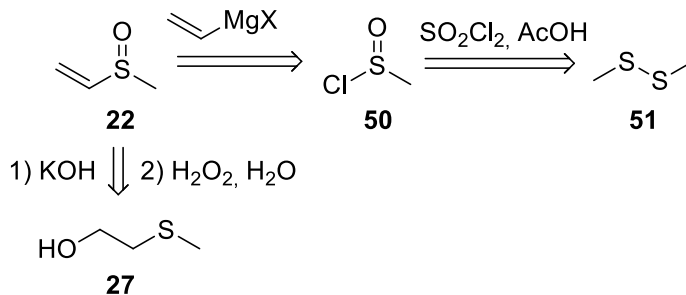


Figure 24. Préparation du méthylsulfinyléthène (**22**).

Le composé **31**, requis pour coupler un réactif de Grignard comportant le soufre à une chromone, dérive du composé **22** (Figure 12). Les voies de synthèse envisageables sont là encore limitées par la nécessité d'obtenir un halogénoalcène anti-Markovnikov : les stratégies possibles exposées pour des chromones à la Figure 23 sont également valables pour obtenir le produit **31**.

L'aldéhyde **35** pourrait également être obtenu à partir du composé **22** (Figure 25). Une addition électrophile classique sur l'alcène permettrait d'abord d'obtenir le dibromure **52** (Vollhardt and Schore, 2009). Un Grignard permettrait ensuite de coupler l'une des positions bromées avec un aldéhyde via le formamide (Olah et al., 1984) pour obtenir le produit **53** et d'autres produits indésirables. La réaction est en effet compliquée par la présence des deux halogènes concurrents. Le produit **53** devrait ensuite être converti en alcool **54** en présence d'oxyde de mercure (Barluenga et al., 1983) ou de sulfate de cuivre (Menchikov et al., 1995). Finalement, cet alcool pourrait subir une déshydratation en milieu acide pour régénérer l'alcène (Vollhardt and Schore, 2009).

Il serait également possible de créer d'abord la chaîne vinylique pour ensuite y ajouter le soufre. On générerait *in situ* du chlorure de formyle à partir d'acide formique (**55**) (Villeneuve and

Chan, 1997). Simultanément, le chlorure de formyle subirait une élongation de chaîne par l'acétylène et une chloration, le tout dans un solvant ionique (Snelders and Dyson, 2011). Cette procédure pourrait permettre d'obtenir le chlorure **57**. Ce dernier pourrait également être généré en échangeant le méthoxy du composé **56** pour un chlore avec du SOCl_2 (Klimko et al., 1964). Il faudrait ensuite protéger l'aldéhyde du produit **57** sous forme de l'acétal **58** (Wuts and Greene, 2007) afin d'éviter que le réactif de Grignard généré à l'étape suivante ne procède à une réaction intramoléculaire. Après utilisation du chlorure pour générer un organomagnésien, deux stratégies seraient possibles.

La première se ferait en deux étapes : d'abord la formation du sulfide **59** à l'aide de méthaneithiol (Koval', 2007), puis l'oxydation douce de celui-ci avec l'acide iodique (Shirini and Zolfigol, 2001) vers le sulfoxide **60**, selon une approche similaire à celle de la Figure 15. L'acétal pourrait se déprotéger lors de cette étape d'oxydation en raison du caractère acide de cette réaction. Dans le cas où la fonction acétal du composé **60** résisterait aux conditions acides de la réaction précédente, la fonction aldéhyde serait régénérée en utilisant des conditions classiques d'hydrolyse d'acétal (Wuts and Greene, 2007) pour obtenir le composé **35**. L'autre voie permettant d'obtenir le composé **60** ferait intervenir un chlorure de sulfinyl directement, selon une méthode similaire à celle utilisée pour obtenir le composé **22** (Li and Liu, 2007).

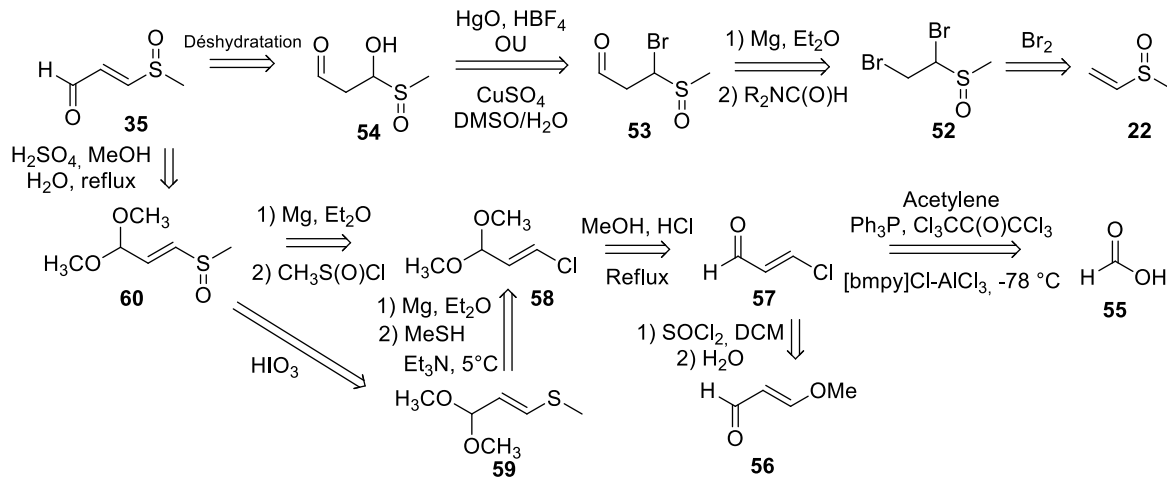


Figure 25. Voies d'obtention du méthylsulfinylpropenal **35**.

Finalement, l'alcyne soufré **37** pourrait être obtenu de trois manières (Figure 26). D'abord, le tribromoéthène (**61**) pourrait être décomposé en bromoéthyne en présence de zinc avec libération de Br_2 (Babayan et al., 1985). Un couplage au palladium serait alors possible avec l'alcène du composé **22** pour obtenir **37**. Le composé **22** pourrait aussi être utilisé dans le cadre d'une métathèse croisée avec le but-1-ène-3-yne (**63**) (Schuster and Blechert, 1997) pour obtenir **37** et son isomère *cis*. Il se poserait cependant un problème de taille pour être sélectif envers l'alcène par rapport à l'alcyne. Cette méthode impliquerait donc des rendements probablement faibles et une purification complexe. Enfin, le méthanthiol s'ajouterait spontanément à **64** en milieu ammoniacal pour fournir **65** (Volkov et al., 1981), qui pourrait alors être oxydé en **37** selon la méthode déjà utilisée plus haut (Shirini and Zolfigol, 2001).

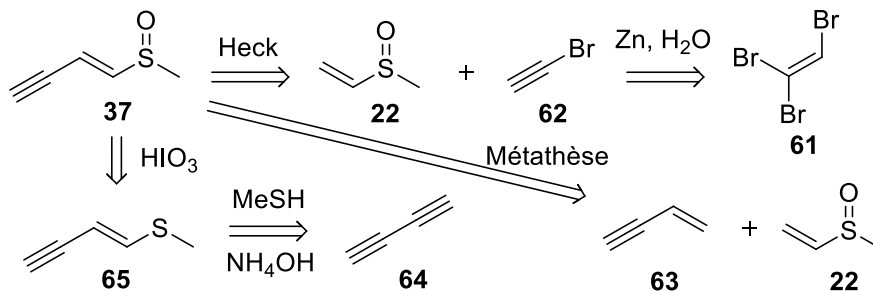


Figure 26. Voies de synthèse de l'alkyne 37.

Substitution de l'aromatique

Trois cas de figure peuvent se présenter. Si la chromone est générée en cours de route, les réactifs de départ pourront être modifiés ou achetés tel que requis. Par exemple, la formation de la chromone à partir du couplage d'un phénol et d'un dérivé acrylique (Figure 20) se prête à l'utilisation de plusieurs polyhydroxybenzènes. Si une substitution particulière n'est pas offerte sur le marché, elle pourrait être réalisée directement sur l'aromatique en utilisant des réactions de substitution classiques (Vollhardt and Schore, 2009).

La seconde possibilité est celle où le réactif de départ est une chromone commerciale. Le cas échéant, certaines substitutions sont déjà disponibles dans le commerce, ce qui réglerait une partie du problème. Les possibilités sont toutefois moindres qu'avec les dérivés benzéniques commerciaux.

Dans le dernier scénario, la substitution devrait être réalisée sur la chromone, que ce soit avant ou après la formation de la chaîne latérale soufrée. C'est alors la chimie des flavonoïdes qui serait la source d'inspiration principale.

La substitution à la position 5 (**66**) n'est pas évidente. Une seule méthode réaliste semble disponible à cet effet. Il s'agit d'une hydroxylation sélective en *ortho* d'un groupement acyle en présence d'un oxydant et d'un catalyseur de palladium (Mo et al., 2012) (Figure 27).

En position 6 (**67**), la substitution pourrait être réalisée par une nitration (Sosnovskikh and Usachev, 2000). L'amine pourrait ensuite être obtenue en condition acide avec du fer, puis l'alcool par l'intermédiaire d'un diazonium (Vollhardt and Schore, 2009).

Aucune méthode n'a été trouvée pour introduire une fonction en position 7 d'une chromone (**68**). Dans ce cas de figure, la meilleure hypothèse consiste à utiliser des réactions classiques de substitution des aromatiques. L'introduction de sulfones en position 6 et 8 (*para* et *ortho*, favorisées par l'éther en position 9, qui plus est en *meta* du carbonyle) permettrait peut-être de donner de la prise à une nitration quelque peu sélective, mais l'encombrement stérique posera un sérieux problème, à tout le moins pour le rendement.

Pour la position 8 (**69**), la nitration envisagée pour la position 6 produirait également une faible quantité de 8-nitroso-chromone (Hay et al., 2008). Alternativement, la position 6 peut être sulfonée, puis la 8 halogénée (Vollhardt and Schore, 2009). Cet halogénure peut ensuite être converti directement en phénol par catalyse au cuivre (Xiao et al., 2013). Une nitration pourrait également être utile après protection de la position 6 par la sulfone. Cette stratégie est sans doute la plus susceptible de fournir un rendement convenable.

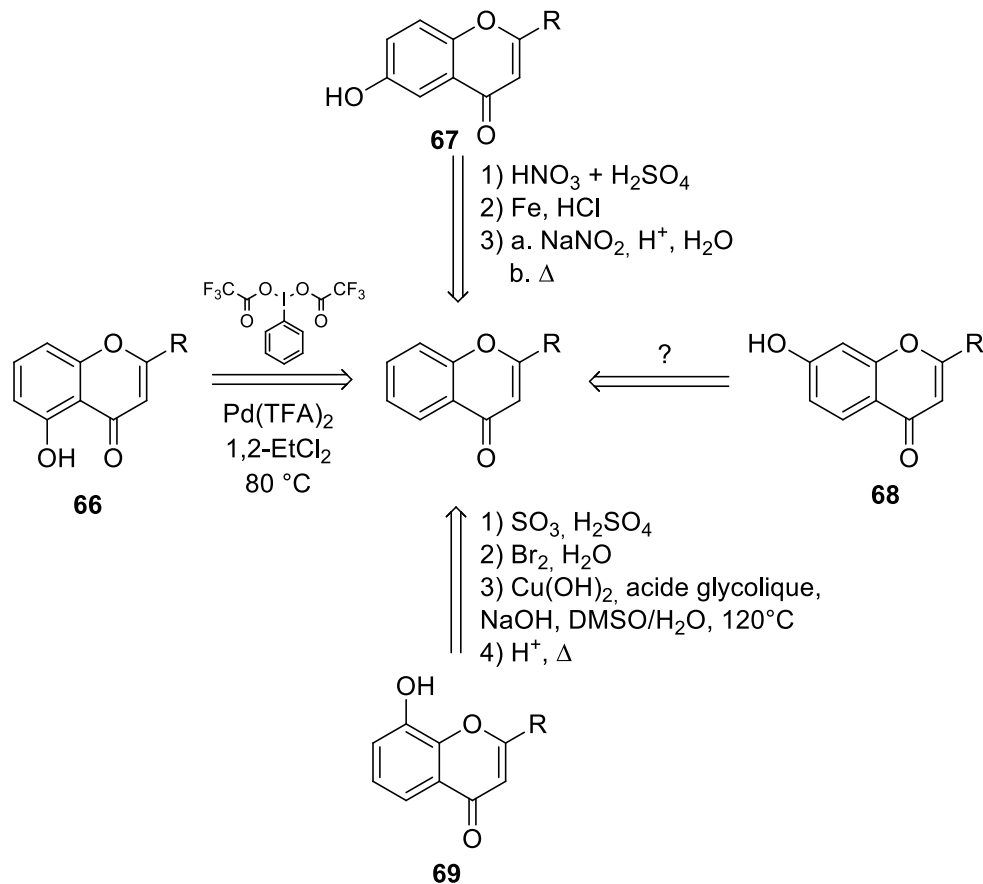


Figure 27. Monosubstitutions d'une chromone déjà formée.

Dans le cas des dérivés disubstitués, des combinaisons de nitrations et de sulfonations pourraient être employées pour obtenir certaines combinaisons (Sosnovskikh and Usachev, 2000; Vollhardt and Schore, 2009). Néanmoins, vu la difficulté d'obtenir ne serait-ce que les dérivés monosubstitués de chromones, les voies de synthèse ne permettant pas de moduler la substitution en amont sont plus difficiles à envisager avec succès.

Bilan des voies de synthèse proposées

À partir des différentes voies synthétiques envisagées ci-haut, quelques constats s'imposent :

- 1) Il est préférable d'utiliser une voie synthétique permettant de moduler la substitution de l'aromatique dès le départ. En effet, la substitution des chromones est difficile.
- 2) Plusieurs voies font appel à des réactifs et des conditions exotiques. Plusieurs réactifs de départ demandent beaucoup d'étapes de préparation.
- 3) L'étape du couplage carbone-carbone est centrale. En effet, elle suivra plusieurs étapes antérieures et sera donc réalisée sur une quantité réduite de réactif. Il est donc préférable de privilégier les méthodes aussi sélectives que possible envers l'isomère *trans*. Cela facilitera également la purification finale.

Le critère 3) élimine le recours à la métathèse. Le critère 2) écarte ensuite les réactifs non commercialement offerts. Cela laisse deux voies de synthèse *a priori* viables (Figure 28). La voie A regroupe la production du méthylsulfinyléthène (**22**) par oxychloration et vinylation par un réactif de Grignard du diméthylsulfide (**51**), la formation de la 2-chloro-chromone **21** par la méthode de Levas et Levas, 1960, et un couplage de Heck en finale menant à **20**. La voie B repose pour sa part sur la réduction de la 2-chromone carboxylic acid **25**, puis une oléfination de Wittig avec le réactif soufré commercial **26** vers la dirchromone **20**. Si quelques dérivés substitués de **25** sont offerts sur le marché, la voie A est plus malléable pour la modification des substituants de l'aromatique en amont, et sera donc priorisée en vertu du critère 1.

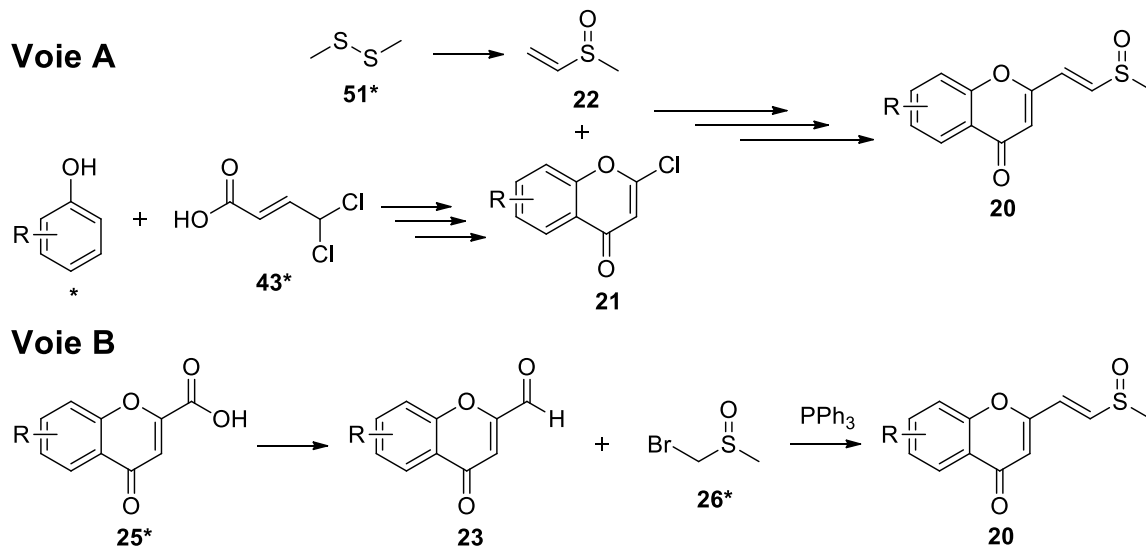


Figure 28. Voies de synthèse les plus prometteuses selon la revue de littérature. Les produits marqués d'un astérisque sont commercialement disponibles.

Évidemment, cette revue de littérature omet certainement des possibilités. Elle permet toutefois d'avoir un aperçu de la complexité synthétique qui se cache derrière la simplicité apparente des dirchromones.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

New Cytotoxic Organic Sulfur Compounds Isolated from *Dirca palustris* L. (Thymelaeaceae)

Présentation

Ce chapitre présente le premier article issu des travaux de caractérisation phytochimique du *dirca* des marais. Il sera soumis à la revue *Organic Letters* en 2014. Il est entièrement consacré aux premiers produits soufrés identifiés chez l'espèce. Un résumé en français précède l'article lui-même.

Résumé

Le présent article rapporte six nouveaux composés soufrés de structure inédite parmi les produits naturels organosoufrés. Les composés identifiés, nommés dirchromones (**1-6**), ont été isolés d'un extrait au dichlorométhane des racines, de l'écorce et du bois de *Dirca palustris*, un arbuste endémique de l'est de l'Amérique du Nord. Leur identification a été basée sur des données RMN, IR et HRMS complètes. Ces composés ont montré de fortes activités cytotoxique et antibactérienne contre les bactéries gram-positif *in vitro*, tout en étant inactifs envers la bactérie gram-négatif *E. coli* et le champignon *Candida albicans*. Il s'agit de la première mention de composés soufrés dans la famille des Thymelaeaceae.

Article**New Cytotoxic Organic Sulfur Compounds Isolated from *Dirca palustris* L. (Thymelaeaceae)**

Alexis St-Gelais, Jean Legault, Vakhtang Mshvildadze, André Pichette*

Université du Québec à Chicoutimi, Chaire de Recherche sur les Agents Anticancéreux d'Origine Naturelle, Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, 555, boulevard de l'Université, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H

2B1

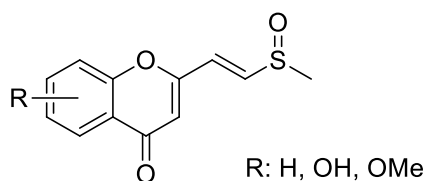
*Corresponding author

E-mail : Andre.Pichette@ugac.ca

Tel : +1-418-545-5011 ext. 5081

Fax : +1-418-545-5012

Abstract



This work reports six novel organic sulfur compounds featuring an unprecedented structure among natural organosulfur compounds. The identified compounds, named dirchromones (**1-6**), were isolated from a dichloromethane extract of the roots, bark and wood of *Dirca palustris*, an endemic shrub of eastern North America. Their identification was based on thorough NMR, IR and HRMS spectroscopic data. These compounds showed potent cytotoxic and gram-positive antibacterial activities in vitro, while being inactive against gram-negative *E. coli* and the fungi *Candida albicans*. This is the first report of sulfur-containing compounds in the Thymelaeaceae family.

Main article

The North American shrub *Dirca palustris* L. (moosewood, eastern leatherwood) is found in maple forests of the eastern halves of Canada and the United States¹. It has alternate, ovate, slightly acuminate leaves^{2,3}. Its tubular yellow flowers show very early in springtime, and possess exserted stamens and style^{2,4,5}. The wood is brittle, but the fibrous bark is flexible and resistant^{3,5,6}. It was peeled in long strips and used as ropes and ties by the First Nations of the east coast and the early European settlers^{3,6-8}. Natives also used the crushed bark against cancer^{3,6,9}. The plant is known to be emetic, laxative and vesicant^{3,6,10-12}.

D. palustris is the only native member of the Thymelaeaceae in the province of Quebec, Canada³. This family is noticeable for its daphnane-type diterpenoid orthoesters, which are among others potent cytotoxic agents¹³. The chemical composition of *D. palustris* has not been extensively studied, with only five phenolic glycosides¹⁴ and three triglycerides¹⁵ reported in the literature. The bioassay-guided fractionation of a cytotoxic extract of the plant led to the isolation of a new group of sulfur-containing secondary metabolites, named dirchromones (**1-6**, figure 1). This study presents the isolation, structural elucidation, cytotoxicity and antibiotic activity of these new compounds.

The dried and ground roots, bark and wood of *Dirca palustris* (12.5 kg)^a were degreased with hexanes and extracted with CH₂Cl₂ (0.57%). The CH₂Cl₂ extract was partitioned between hexanes and MeOH. The polar fraction (50 g) was submitted to low pressure liquid chromatography over silica gel using a CH₂Cl₂/MeOH gradient (100:0 to 0:100), yielding subfractions A-E. Subfraction B (23.9 g) was refined over silica gel with hexanes/EtOAc as a gradient (3:1 to 1:1), then MeOH, giving B1-B7 subfractions. Subfraction B7 (4.28 g) was purified over silica gel with a hexanes/acetone gradient (2:1 to 0:100), then MeOH, affording subfractions B7A-B7H. The subfraction B7D (344 mg) was further purified using preparative HPLC to yield compounds **1** (35.9 mg), **3** (29.7 mg), **4** (6.7 mg) and **6** (10.9 mg). Purification in the same HPLC conditions of subfraction B7E (287 mg) afforded compound **2** (15.9 mg), **4** (6.9 mg) and **6** (5.3 mg). Finally, compound **5** (10.5 mg) was purified from subfraction B7F, again using preparative HPLC. All

^a Whole plants were collected by Alexis St-Gelais, Hubert Marceau and Myriam Gauthier in May 2012 in Repentigny, Québec, Canada. A specimen of the collected plants was identified by Patrick Nadeau (biology technician, Université du Québec à Chicoutimi) and submitted to herbarium Louis-Marie at Université Laval, Québec (reference number QFA0375681).

compounds appear as yellow-green spots on TLC examined under 365 nm UV light; the color is enhanced by spraying with H₂SO₄ and heating 5 min at 110 °C.

Compound **1** was isolated as an optically inactive amorphous white solid. Its ESI-TOF-MS analysis showed a pseudomolecular [M+H]⁺ peak at *m/z* 235.0415, suggesting the molecular formula C₁₂H₁₀O₃S (calcd for C₁₂H₁₁O₃S 235.0423), with an intense [M+H+2]⁺ peak (4.7%), also indicative of a sulfur atom. An IR absorption peak at 1643 (s) cm⁻¹ suggested a carbonyl function. A conjugated olefin was suspected from two bands at 1609 (s) and 2928 (m) cm⁻¹. A sulfoxide function was also indicated by a strong peak at 1061 cm⁻¹ (S=O stretch¹⁶) and a broad band at 3449 cm⁻¹. ¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT-135 spectra indicated one carbonyl, one methyl, seven sp² methines and three quaternary carbons. COSY correlations (figure 1) showed two separate systems: the *trans*-alkene formed by H11 and H12 doublets, also apparent from their large coupling constant (*J* = 14.9 Hz); and the aromatic H5-H6-H7-H8, part of an ortho disubstituted ring. In addition to their coupling pattern, the proper assignment of the latter was further confirmed by comparison of their related carbons shifts with those of flavone¹⁷. HMBC correlations (figure 1) suggested that H14 was in β position of C12. The presence of a sulfoxide in α was inferred from the peculiar shift of C14, similar to that of DMSO-*d*6 solvent residual peak, in addition to previous evidence of a sulfur atom. The HMBC further indicated that C2 has correlations with H11 and H12, thus being the lateral chain attachment point, as well as with C3, which is part of an alkene from its chemical shift. The high shift of C2 is further explained by the presence of an ether bond. The singlet H3 in turn correlates with the carbonyl C4 and the quaternary C10, the latter having correlation with C6 and thus being part of the aromatic ring. This evidence lead to the assignment

of (*E*)-2-[(2-methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one as the structure of **1**, which was given the trivial name dirchromone^b.

Compound **2** was isolated as an optically inactive amorphous yellow powder. Its pseudomolecular [M+H]⁺ ion peak at *m/z* 251.0371 corresponded to the molecular formula C₁₂H₁₀O₄S (calcd for C₁₂H₁₁O₄S 251.0373), again with an intense [M+H+2]⁺ peak (4.6%) from the sulfur atom. An IR absorption peak at 3182 (br, m) cm⁻¹ indicated a phenolic compound. A band at 1633 (s) cm⁻¹ once again pointed to a carbonyl function. A sulfoxide group could here too be suspected from the medium absorption band at 1025 cm⁻¹. As in **1**, a conjugated olefin induced two bands at 1612 (s) cm⁻¹ and 2928 (m) cm⁻¹. ¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT-135 spectra indicated one carbonyl, one methyl, six sp² methines and four quaternary carbons. The non-aromatic portion of the molecule was very similar to **1** and a common skeleton was indeed found from the corresponding correlations (figure 1). The COSY and the multiplicity pattern of aromatic protons indicated a trisubstituted aromatic ring, with positions 6 and 9 bearing oxygen due to high chemical shifts. The correlation between H3 and C5, and the meta-coupling behavior of H5 doublet, lead to the final determination of the ring substitution, which was confirmed by comparison to 6-hydroxyflavone¹⁸. These spectroscopic data pointed at (*E*)-6-hydroxy-2-[(2-

^b Dirchromone (**1**): White amorphous powder; UV (IPA) λ_{max} (log ε): 204 (4.463), 251 (4.265), 302 (4.268); IR (film) ν_{max}: 3449, 3049, 2923, 2854, 1643, 1609, 1562, 1515, 1465, 1387, 1332, 1305, 1246, 1223, 1122, 1061, 968, 880, 857, 817, 779, 756, 677 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.20 (dd, J = 8.0, 1.7, H3), 7.71 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.7, H7), 7.55 (d, J = 14.9, H12), 7.48 (d, J = 7.6, H8), 7.43 (t, J = 8.4, H6), 7.06 (d, J = 14.9, H11), 6.41 (s, H3), 2.80 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 235.0415 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₃S 235.0423).

methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one being the structure of **2**, which was named 6-hydroxydirchromone^c.

Compounds **3-6** were assigned in a similar manner. The pyranone and the lateral chain exhibited a relatively constant NMR behavior, and could thus easily be assigned as soon as the characteristic sulfur-bonded methyl signal near 40 ppm was detected. The analysis of 2D NMR spectra and the comparison of found structures with their respective flavone analogue^{19,20} indicated that **3** was (*E*)-6-methoxy-2-[(2-methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one (6-methoxydirchromone^d), **4** was (*E*)-7-methoxy-2-[(2-methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one (7-methoxydirchromone^e), **5** was (*E*)-6,7-dimethoxy-2-[(2-methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one

^c 6-Hydroxydirchromone (**2**): Yellow amorphous powder; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ): 203 (4.219), 225 (3.965), 266 (3.949), 307 (3.839); IR (film) ν_{\max} : 3379, 3182, 3060, 2961, 2928, 2857, 1633, 1613, 1470, 1404, 1359, 1325, 1250, 1193, 1163, 1122, 1025, 977, 959, 823, 773 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.97 (d, *J* = 15.2, H12), 7.47 (d, *J* = 9.3, H8), 7.25 (d, *J* = 3.1, H5), 7.24 (dd, *J* = 9.3, 3.1, H7), 6.98 (d, *J* = 15.2, H11), 6.59 (s, H3), 2.77 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 251.0373 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₄S, 251.0373).

^d 6-Methoxydirchromone (**3**): Beige amorphous powder; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ): 205 (4.608), bend 228 (4.227), 272 (4.082), 301 (3.880); IR (film) ν_{\max} : 3395, 3062, 3005, 2960, 2926, 2852, 1633, 1614, 1515, 1485, 1460, 1438, 1381, 1363, 1313, 1291, 1282, 1243, 1209, 1119, 1156, 1028, 973, 860, 830, 733 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.56 (d, *J* = 3.1, H5), 7.52 (d, *J* = 15.0, H12), 7.42 (d, *J* = 9.2, H8), 7.30 (dd, *J* = 9.2, 3.1, H7), 7.05 (d, *J* = 15.0, H11), 6.40 (s, H3), 2.79 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 265.0528 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₄S, 265.0529).

^e 7-Methoxydirchromone (**4**): Brownish amorphous powder; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ): 208 (4.565), 238 (4.301), 310 (4.244); IR (film) ν_{\max} : 3390, 3059, 3003, 2954, 2926, 2854, 1638, 1613, 1517, 1461, 1440, 1390, 1361, 1327, 1283, 1238, 1204, 1163, 1118, 1089, 1025, 963, 922, 836, 733 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.98 (d, *J* = 15.1, H12), 7.92 (d, *J* = 8.8, H5), 7.11 (d, *J* = 2.4, H8), 7.07 (dd, *J* = 8.8, 2.4, H6), 7.00 (d, *J* = 15.1, H11), 6.63 (s, H3), 3.92 (s, 7-OMe), 2.78 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 265.0516 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₄S, 265.0529).

(6,7-dimethoxydirchromon^f) and **6** was (*E*)-7,8-dimethoxy-2-[(2-methylsulfinyl)vinyl]-4*H*-chromen-4-one (7,8-dimethoxydirchromone^g).

Dirchromones are the first report of sulfur-containing secondary metabolites in the Thymelaeaceae. Indeed, sulfur compounds are relatively scarce among superior plants. They are noticeably found within two major groups. The Alliaceae family members produce cysteine-derived sulfoxides, among which alliin, whose degradation products following enzymatic cleavage have attracted considerable research efforts due in good part to their cancer chemopreventive properties²¹⁻²⁴. Similarly, members of the Brassicales order, as well as the Pittosporaceae, the Phytolaccaceae and the Drypetes genus, contain sulfur-bearing glucosinolates, which are converted to isothiocyanates and related products by myrosinases²⁵. Glucosinolates have also drawn interest given their proapoptotic²⁶⁻²⁸ and chemopreventive properties²⁹⁻³¹.

Consequently, the cytotoxicity of compounds **1-6** was evaluated in vitro against human cancer and healthy cell lines including lung adenocarcinoma (A549), colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and skin fibroblasts (WS1), using Hoechst assay³². The results presented in Table 2 are expressed as the concentration inhibiting 50% of cell growth (IC₅₀). Etoposide used as a positive control selectively inhibited cancer cells growth with IC₅₀ of 0.48 μM for A549 and 3.3 μM for DLD-

^f 6,7-Dimethoxydirchromone (**5**) : Beige amorphous powder; UV (IPA) λ_{max} (log ε): 210 (4.531), 241 (4.270), 260 (4.065), 310 (4.093) ; IR (film) ν_{max} : 3412, 3056, 3008, 2955, 2928, 2850, 1641, 1613, 1509, 1476, 1459, 1380, 1327, 1272, 1219, 1201, 1166, 1122, 1080, 1029, 1007, 960, 861, 826, 731 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.52 (s, H5), 7.48 (d, *J* = 15.0, H12), 7.03 (d, *J* = 15.0, H11), 6.91 (s, H8), 6.38 (s, H3), 4.01 (s, 7-OMe), 3.99 (s, 6-OMe), 2.78 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 295.0635 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₄S, 295.0635).

^g 7,8-Dimethoxydirchromone (**6**) : Brownish amorphous powder; UV (IPA) λ_{max} (log ε): 209 (4.690), 256 (4.372), 310 (4.286) ; IR (film) ν_{max} : 3417, 3053, 3002, 2950, 2926, 2852, 1634, 1603, 1584, 1562, 1513, 1464, 1455, 1429, 1391, 1333, 1287, 1234, 1212, 1177, 1128, 1099, 1059, 1031, 979, 808, 778, 719 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (d, *J* = 9.0, H5), 7.56 (d, *J* = 15.0, H12), 7.06 (d, *J* = 15.0, H11), 7.05 (d, *J* = 9.0, H6), 6.35 (s, H3), 4.01 (s, 7-OMe), 4.00 (s, 8-OMe), 2.80 (s, H14); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) data, see Table 1; ESI-TOF-MS *m/z* 295.0635 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₁O₄S, 295.0635).

1. Results showed that dirchromone **1** and monomethoxydirchromones **3-4** were the most active compounds against all tested cell lines. In addition, they have been found to be 5 to 10 times more active against DLD-1 (IC₅₀: 1.0 to 1.8 μM) in comparison with A549 (IC₅₀: 9 to 10.5 μM) and WS-1 (IC₅₀: 6 to 9 μM) suggesting some selectivity towards colon cancer cells. Interestingly, the addition of a hydroxyl group at position R₁ (compound **2**) significantly reduced the cytotoxicity of the dirchromone. The presence of two methoxy groups in positions R₁ and R₂ (**5**) or R₂ and R₃ (**6**) also decreased cytotoxicity.

Furthermore, sulfur-containing compounds from Alliaceae and Brassicales have well known antimicrobial properties³³⁻³⁶. Therefore, antibacterial activity of compounds **1-6** was also evaluated against gram negative *E. coli* and gram positive *S. aureus* using a modified microdilution method³⁷. Gentamycin was used as a positive control. The results presented in Table 3, expressed as the dilution at which at least 90% of bacterial proliferation was inhibited (MIC₉₀), showed that all compounds were active against *S. aureus* with MIC₉₀ ranging from 15.6 to 62.5 μM. Compound **3** was the most active. The presence of a methoxy group in position R₂ seems to be detrimental to the antibacterial activity. In contrast, none of the compounds showed activity against either *E. coli* nor the fungi *Candida albicans* (data not shown).

Associated Content

Supporting information

Experimental section, antibacterial and antifungal assays method, NMR and IR spectra of compounds **1-6**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment

The authors acknowledge the “Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d’origine naturelle” and the Canadian Institutes of Health Research for funding and the FRQNT and NSERC for scholarships. They also thank “Sentiers de la Presqu’île Inc.” for allowing collection of plant specimens from its private maple forest, Dr Serge Lantagne (Direction du laboratoire d’expertises et d’analyses alimentaires, Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec) for locating the first *D. palustris* test samples, and Serge Lavoie, François Simard, Carole Grenon, Catherine Dussault and Karl Lalancette for support and counsels.

References

- (1) United States Department of Agriculture. *Dirca palustris* L. - Eastern Leatherwood <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=dipa9> (accessed Jun 26, 2012).
- (2) Gleason, H. A.; Cronquist, A. Manual of vascular plants of Northeastern United States and Adjascent Canada; 2nd ed.; The New York Botanical Garden: Bronx (NY), 1993.
- (3) Marie-Victorin. Flore laurentienne; 3e ed.; Gaëtan Morin éditeur: Montréal, 2002.
- (4) Williams, C. Plant Species Biol. 2004, 19, 101.
- (5) Gray, A.; Fernald, M. L. Gray’s Manual of Botany; American Book: New York, 1970; p. 1044.

- (6) Erichsen-Brown, C. *Medicinal and Other Uses of North American Plants - A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes*; Dover Publications, Inc.: New York, 1979; pp. 179–180.
- (7) Core, E. L. *Econ. Bot.* 1967, 21, 198.
- (8) Moerman, D. E. *Native American Ethnobotany*; Timber Press, Inc.: Portland (OR), 1998; pp. 201–202.
- (9) Hartwell, J. L. *Plants Used Against Cancer: a Survey*; Quarterman Publications: Lawrence, 1982; p. 602.
- (10) Bigelow, J. *American Medical Botany*; Cummings and Hilliard: Boston, 1818; pp. 154–159.
- (11) Lampe, K. F.; Fagerström, R. *Plant Toxicity and Dermatitis: a Manual for Physicians*; Williams & Wilkins: Baltimore (MD), 1968; p. 231.
- (12) Remington, J. P.; Woods, H. C. *The Dispensatory of the United States of America*; 20th ed.; Lippincott, 1918.
- (13) Liao, S.-G.; Chen, H.-D.; Yue, J.-M. *Chem. Rev.* 2009, 109, 1092.
- (14) Ramsewak, R. S.; Nair, M. G.; DeWitt, D. L.; Mattson, W. G.; Zasada, J. J. *Nat. Prod.* 1999, 62, 1558.
- (15) Ramsewak, R. S.; Nair, M. G.; Murugesan, S.; Mattson, W. J.; Zasada, J. J. *Agric. Food. Chem.* 2001, 49, 5852.

- (16) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identification spectrométrique des composés organiques; 2nd ed.; De Boeck Université: Brussels, Belgium, 2005; p. 501.
- (17) Ternai, B.; Markham, K. R. *Tetrahedron* 1976, 32, 565.
- (18) Park, Y.; Moon, B.; Lee, E.; Lee, Y.; Yoon, Y.; Ahn, J.-H.; Lim, Y. *Magn. Reson. Chem.* 2007, 45, 674.
- (19) Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids; Agrawal, P. K., Ed.; Elsevier, 1989; p. 564.
- (20) Iinuma, M.; Matsuura, S.; Kusuda, K. *Chem. Pharm. Bull.* 1980, 28, 708.
- (21) Ariga, T.; Seki, T. *BioFactors* 2006, 26, 93.
- (22) Cerella, C.; Kelkel, M.; Viry, E.; Dicato, M.; Jacob, C.; Diederich, M. In *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health*; Rasooli, I., Ed.; InTech, 2011.
- (23) Scherer, C.; Jacob, C.; Dicato, M.; Diederich, M. *Phytochem. Rev.* 2009, 8, 349.
- (24) Powolny, A. A.; Singh, S. V. *Cancer Lett.* 2008, 269, 305.
- (25) Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T.; Talalay, P. *Phytochemistry* 2001, 56, 5.
- (26) Gamet-Payrastre, L.; Li, P.; Lumeau, S.; Cassar, G.; Dupont, M.-A.; Chevolleau, S.; Gasc, N.; Tulliez, J.; Tercé, F. *Cancer Res.* 2000, 60, 1426.
- (27) Nomura, T.; Shinoda, S.; Yamori, T.; Sawaki, S.; Nagata, I.; Ryoyama, K.; Fuke, Y. *Cancer Detect. Prev.* 2005, 29, 155.
- (28) Stoewsand, G. *Food Chem. Toxicol.* 1995, 33, 537.

- (29) Talalay, P.; Fahey, J. J. *Nutr.* 2001, 131, 3027S.
- (30) Cheung, K. L.; Kong, A.-N. *AAPS J.* 2010, 12, 87.
- (31) Zhang, Y.; Talalay, P. *Cancer Res.* 1994, 54, 1976s.
- (32) Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. *Anal. Biochem.* 1990, 191, 31.
- (33) Kyung, K. H.; Fleming, H. P. J. *Food Prot.* 1997, 60, 67.
- (34) Kyung, K. H.; Lee, Y. C. *Food Rev. Int.* 2001, 17, 183.
- (35) Ankri, S.; Mrelman, D. *Microbes Infect.* 1999, 1, 125.
- (36) Harris, J. C.; Cottrell, S. L.; Plummer, S.; Lloyd, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57, 282.
- (37) Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin, C. J. *Antimicrob. Chemother.* 2003, 52, 796.

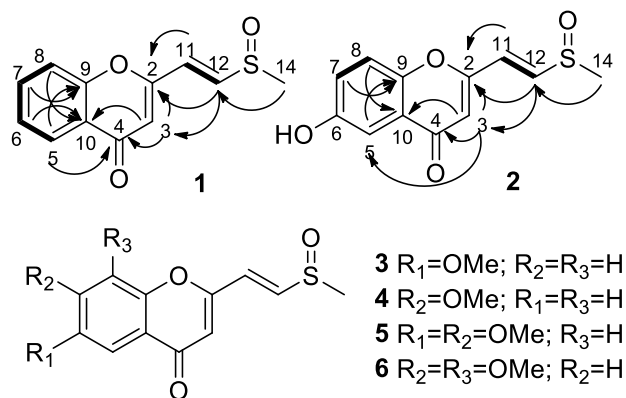


Figure 1. Structures of dirchromones **1-6**, with 2D NMR highlights for compounds **1** and **2**. Solid lines indicate DQF-COSY correlations, and arrows HMBC correlations.

Table 1. ^{13}C NMR Data of Compounds 1-6 (δ in ppm)

no.	1 *	2 **	3 *	4 **	5 *	6 *
2	158.0, q	158.1, q	157.8, q	158.2, q	157.4, q	157.8, q
3	113.2, t	111.0, t	112.4, t	112.1, t	112.8, t	112.8, t
4	178.3, q	177.2, q	178.1, q	176.6, q	177.3, q	177.9, q
5	125.9, t	107.6, t	105.0, t	126.4, t	104.5, t	121.3, t
6	125.5, t	155.9, q	157.2, q	114.7, t	147.9, q	110.1, t
7	134.3, t	123.8, t	124.3, t	164.1, q	154.9, q	157.1, q
8	117.8, t	119.4, t	119.3, t	100.6, t	99.5, t	136.7, q
9	155.9, q	148.7, q	150.7, q	157.2, q	152.0, q	150.2, q
10	124.0, q	124.3, q	124.7, q	117.2, q	117.5, q	118.7, q
11	127.4, t	125.7, t	127.5, t	125.5, t	127.6, t	127.5, t
12	141.7, t	143.8, t	141.4, t	143.9, t	140.7, t	141.4, t
14	40.4, p	39.6, p	40.4, p	39.6, p	40.4, p	40.4, p
6-OMe			56.0, p		56.4, p	
7-OMe				56.1, p	56.5, p	56.5, p
8-OMe						61.6, p

p : primary, t: tertiary, q: quaternary * In CDCl_3 , referenced to TMS. ** In DMSO-d_6 , referenced to main solvent residual peak at 39.5 ppm.

Table 2. Cytotoxicity of compounds 1-6

Compound	IC_{50} (μM)		
	A549	DLD-1	WS1
1	10 ± 1	1.0 ± 0.1	9 ± 1
2	>63	20 ± 2	31 ± 4
3	9 ± 1	1.1 ± 0.1	6 ± 1
4	10.5 ± 0.6	1.8 ± 0.2	9 ± 1
5	16 ± 2	4.2 ± 0.3	14 ± 1
6	20 ± 1	3.3 ± 0.4	16 ± 2
Etoposide	0.48 ± 0.08	3.3 ± 0.7	>50

Table 3. Antibacterial activity of compounds **1-6**

Compound	MIC ₉₀ (μM), <i>S. aureus</i>
1	15.6
2	31.3
3	15.6
4	31.3
5	62.5
6	62.5
Gentamycin	0.084

CHAPITRE IV

ISOLATION ET CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS

Le présent projet a la particularité d'avoir été amorcé dans le cadre du baccalauréat en chimie des produits naturels. Il y a donc eu deux séries de fractionnement. La première s'est faite à partir d'une récolte de *Dirca palustris* récolté à Québec en juillet 2010 (1,88 kg) et a permis d'isoler quelques-uns des composés présentés dans cette maîtrise. Cependant, la majeure partie de ce travail maîtrise a été effectué à partir d'une quantité beaucoup plus importante de dirca (12,5 kg), récoltée à Repentigny en mai 2012. Cette section se concentre sur les travaux d'isolation réalisés en cours de maîtrise, mais présente un résumé du fractionnement réalisé au baccalauréat ainsi que l'ensemble des molécules caractérisées.

Fractionnement bioguidé à partir de la récolte de Repentigny (travaux de maîtrise)

Choix de la méthode d'extraction

Lors de la première extraction, l'extrait brut (méthanol et méthanol/eau 80 % à reflux) avait été fractionné par extractions liquide-liquide successives avec hexane, dichlorométhane et n-butanol. En connaissant mieux la matrice, il devenait évident que c'était surtout la partie peu polaire de l'extrait qui était intéressante. Avant d'extraire le dirca de Repentigny, plusieurs méthodes d'extraction plus ciblées ont donc été comparées qualitativement (Tableau 3). Il est ressorti de cette comparaison que le fractionnement liquide-liquide était la méthode la moins apte à produire un extrait sélectif. Le dégraissage à l'hexane semble surtout évacuer des composés cytotoxiques peu sélectifs et des produits interférents, ce qui en fait un ajout intéressant. L'extraction aux micro-ondes ne permet pas d'obtenir de bons rendements et est difficile à mettre en place (ébullition violente du solvant, absence de matériel disponible). Tant les ultrasons que le

soxhlet étaient donc des méthodes valables. C'est la seconde méthode qui a été retenue, puisqu'elle permettait de mieux dégraisser l'extrait.

Tableau 3. Comparaison sommaire de différentes méthodes d'extraction des tiges, racines et écorce broyées de *Dirca palustris* sur la base de leur activité cytotoxique par le test Hoechst et de leur rendement

Méthode d'extraction	Solvant	Rendement	IC ₅₀ A-549 (µg/ml)	Sélectivité*
Partition liquide-liquide d'extrait total**	DCM seul	2.44 %	>125	Toxique
	Hexane	0.88 %	1,6 ± 0,3	52
	DCM, après hexane	1.00 %	3,6 ± 0,9	>35
Soxhlet	DCM seul	3.06 %	1,2 ± 0,4	>104
	Hexane	1.78 %	>125	Toxique
	DCM, après hexane	0.85 %	1,5 ± 0,5	>128
Extraction à reflux	Hexane	1.75 %	1,0 ± 0,6	>125
	DCM, après hexane	0.49 %	<0,977	>127
Extraction aux micro-ondes	Hexane	1.38 %	1,2 ± 0,2	>104
	DCM, après hexane	0.71 %	<0,977	>127
Extraction aux ultrasons	Hexane	0.74 %	3,7 ± 0,5	>33
	DCM, après hexane	1.13 %	<0,977	>128

*IC_{50(A-549)}/IC_{50(WS-1)}. La mention « toxique » indique une absence de sélectivité.

**La matière végétale est extraite à reflux dans du méthanol et un mélange méthanol/eau 8:2. L'extrait sec est ensuite repris dans l'eau et soumis à une extraction liquide-liquide avec le solvant indiqué dans la colonne « Solvant ». La phase organique est soumise à un test de cytotoxicité.

Schéma de fractionnement

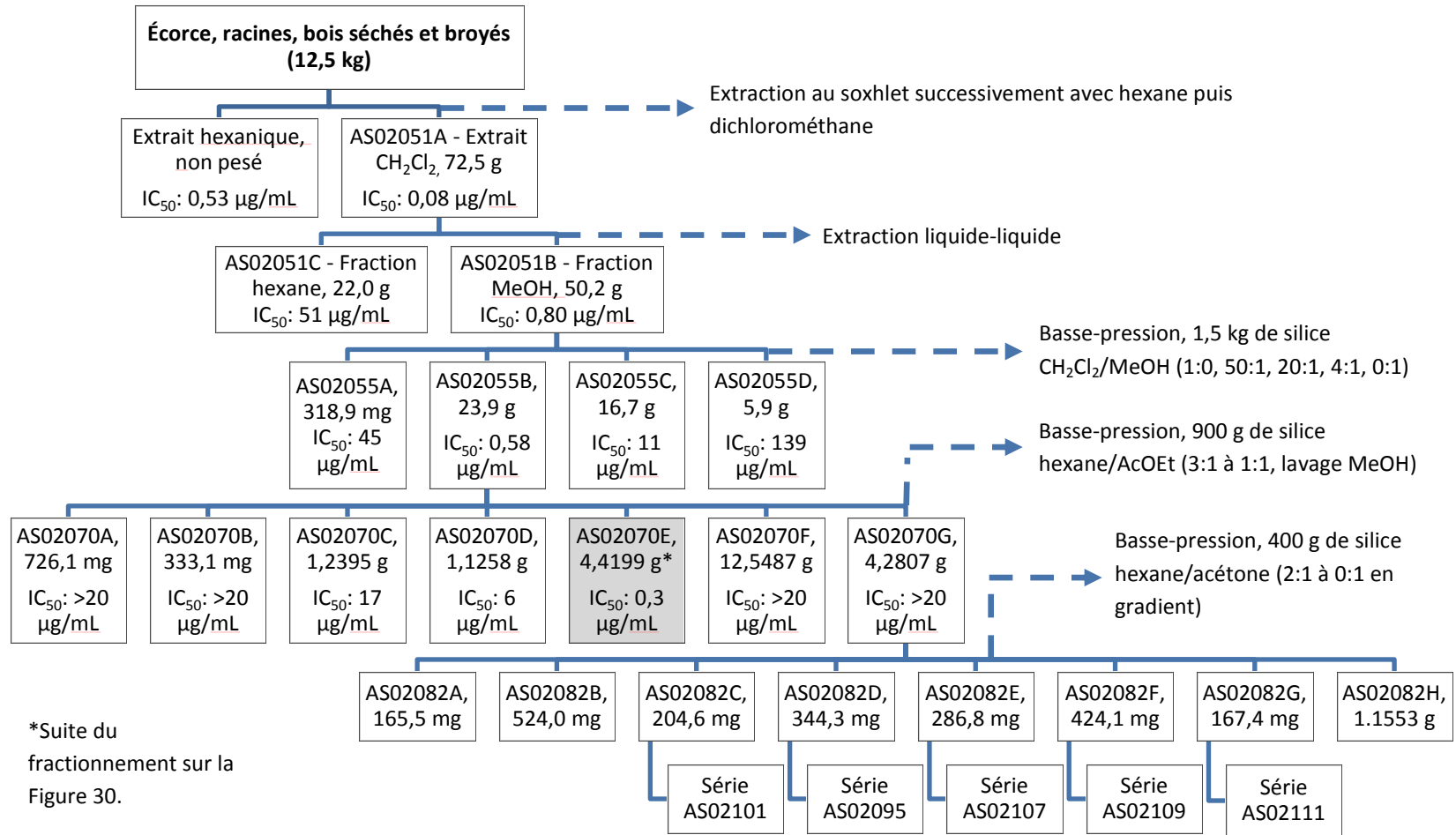


Figure 29. Première partie du schéma de fractionnement de *Dirca palustris*. Les séries sont les fractions obtenues par HPLC préparative. Les IC₅₀ présentés ont été obtenus avec la lignée cellulaire cancéreuse A-549.

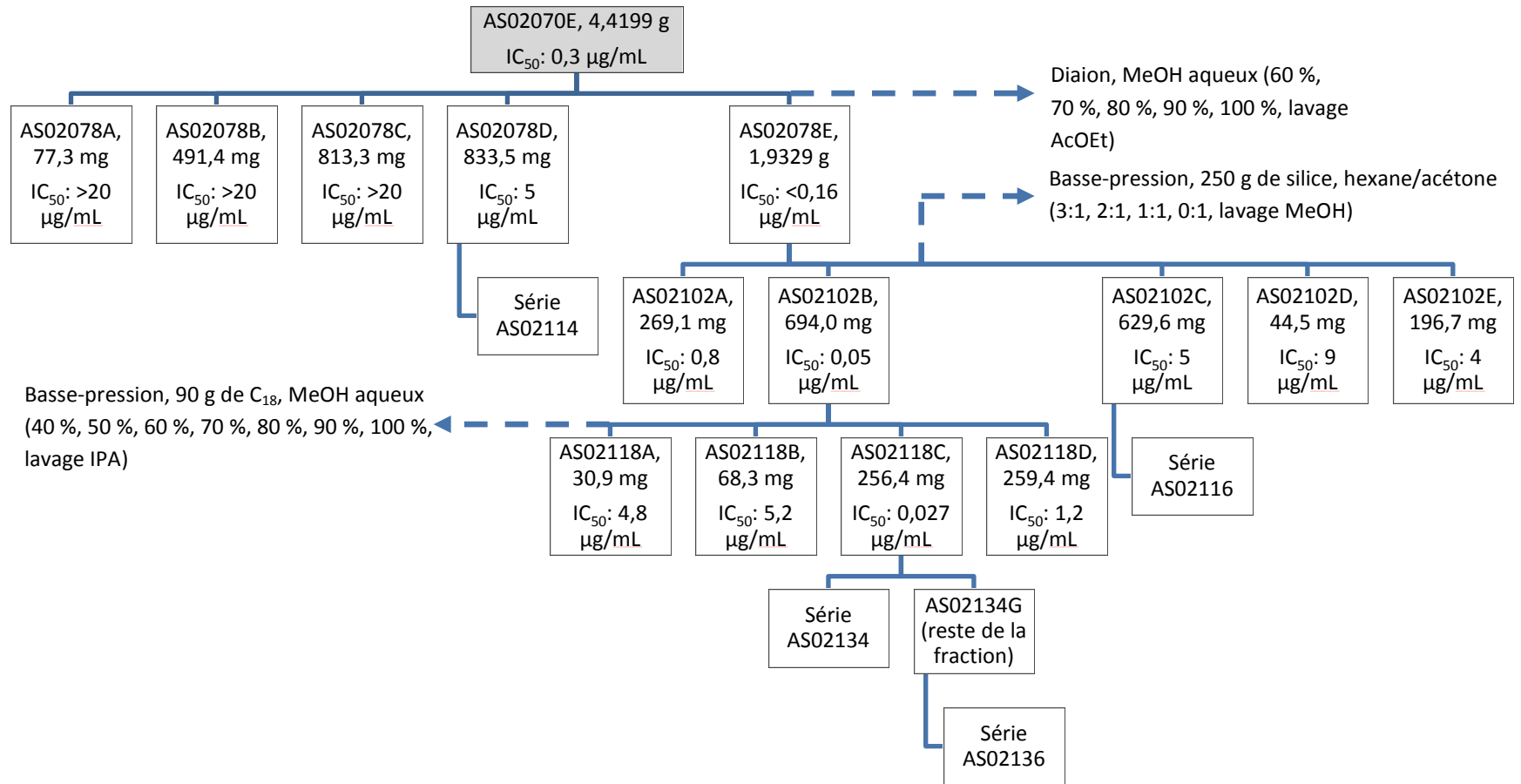


Figure 30. Seconde partie du schéma de fractionnement de *Dirca palustris*. Les séries sont les fractions obtenues par HPLC préparative. Les IC₅₀ présentés ont été obtenus avec la lignée cellulaire cancéreuse A-549.

Le schéma de fractionnement ci-haut (Figure 29 et Figure 30) a été développé sur la base du suivi de l'activité biologique sur les cellules cancéreuses A-549. L'IC₅₀ des extraits initiaux est étrangement intense par rapport aux tests d'extraction, qui indiquent plutôt un IC₅₀ autour de 1,0-1,5 µg/mL. Hormis cela, la purification augmente efficacement l'activité d'étape en étape. Quant à la fraction AS02070G, enrichie en dirchromones, elle a été repérée par CCM et HPLC-MS sur la base des deux structures déjà identifiées lors du projet de baccalauréat. C'est pour cette raison qu'elle a également été soumise à des travaux de purification.

Composés isolés à partir de la récolte de Repentigny (travaux de maîtrise)

Les produits ont tous été isolés par chromatographie liquide haute pression préparative sur colonne de phase inverse C18 avec des gradients d'acétonitrile ou de méthanol dans l'eau, sauf avis contraire. Ils sont présentés par série, selon le schéma de fractionnement présenté ci-haut (Figure 29 et Figure 30).

Série AS02101

Trois composés ont été isolés dans cette série. La dirchromone est décrite au chapitre III. Les deux autres produits ont été identifiés par comparaison de leurs spectres RMN et de leur indice de rotation avec la littérature : le (±)-laricirésinol (**70**) (Badawi et al., 1983; Wang et al., 2009) et le (-)-syringarésinol (**71**) (Wang et al., 2009) (Figure 31). Ceux-ci ont déjà été isolés chez *D. occidentalis* et montrent une activité cytotoxique modérée sur des cellules leucémiques (Badawi et al., 1983).

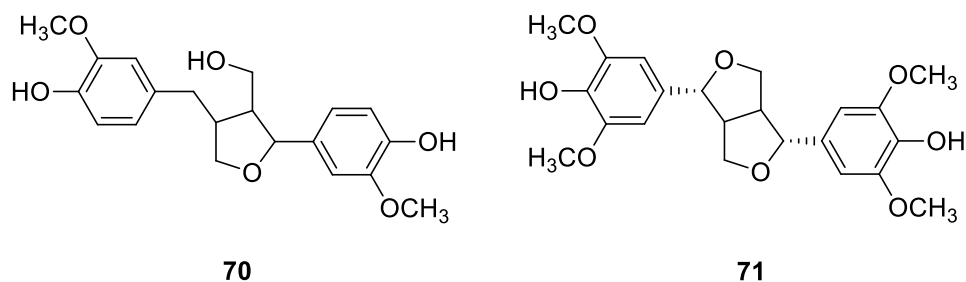


Figure 31. Structures du (±)-laricirésinol (**70**) et du (-)-syringarésinol (**71**).

Série AS02095

Cette série a permis d'isoler quatre composés, présentés au chapitre III : davantage de dirchromone, la 7,8-diméthoxydirchromone, la 7-méthoxydirchromone et la 6-méthoxydirchromone.

Série AS02107

On trouvait dans cette série la 6-hydroxydirchromone, la 7,8-diméthoxydirchromone, ainsi que de nouveau les 7-méthoxydirchromone et 6-méthoxydirchromone (voir chapitre III). La série contenait également un autre composé soufré, baptisé dircoxépine (**72**) (Figure 32).

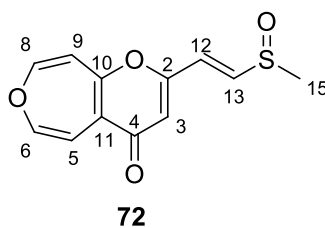


Figure 32. Structure de la dircoxépine.

Le composé **72** a été obtenu sous forme de résidu orange amorphe. Son analyse par ESI-TOF-MS montrait un pic ionique pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de $m/z=251,0386$, indiquant la

formule moléculaire $C_{12}H_{10}O_4S$ (calculé pour $C_{12}H_{11}O_4S$: 251,0373), avec un pic à $[M+H+2]^+$ d'une intensité de 4,0 %, indice d'un atome de soufre. Le spectre FTIR de la molécule ressemblait également très fortement à ceux des dirchromones, avec la présence d'une fonction sulfoxide, d'alcènes conjugués et d'un carbonyle. L'analyse par RMN montrait la présence d'un méthyle, de sept méthines oléfiniques et de quatre carbones quaternaires, incluant le groupe carbonyle. Même si *a priori* la masse laissait croire à une dirchromone monohydroxylée, le déplacement chimique des protons ne montrait pas la présence d'un noyau aromatique. Une étude plus attentive des spectres a montré une première moitié de molécule similaire aux dirchromones, comptant la chaîne latérale soufrée et la pyranone. Une corrélation HMBC entre H5 et C4 a confirmé le lien C5-C11, et C10 a été assigné sur la base d'une seconde corrélation avec H5. H5-H6 et H8-H9 formaient deux systèmes de spins distincts selon le COSY et les multiplicités. Les constantes de couplage indiquaient des conformations *cis*, et le blindage correspondait davantage à des alcènes déblindés qu'à un cycle aromatique. Le lien C9-C10 a été établi sur la base des corrélations HMBC de H9 avec C10 et C11. C6 et C8 étaient plus fortement déblindés et corrélaient entre eux par HMBC. L'atome d'oxygène restant à assigner pour compléter la formule moléculaire identifiée par MS ne pouvait donc qu'être placé entre les deux, formant un cycle oxépine. Il s'agit d'une nouvelle molécule de structure originale, et probablement liée biosynthétiquement aux dirchromones (Annexe I).

Dircoxépine (72)

Résidu amorphe orange; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ) : 206 (3.493), 281 (3.083); IR ν_{\max} (film) : 3369, 2927, 2854, 1711, 1640, 1615, 1562, 1517, 1462, 1425, 1375, 1326, 1281, 1217, 1175, 1156, 1116, 1046, 962, 859, 838, 765 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.81 (d, $J=15.2$, H13), 6.87 (d, $J=15.2$,

H12), 6.58 (s, H3), 6.44 (d, $J=6.5$, H8), 6.04 (d, $J=6.2$, H6), 5.78 (d, $J=6.2$, H5), 5.76 (d, $J=6.5$, H9), 2.73 (s, H15); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 175.5 (C4), 160.9 (C10), 157.8 (C2), 154.1 (C8), 145.4 (C6), 143.4 (C13), 124.6 (C12), 122.3 (C11), 114.1 (C3), 110.1 (C9), 108.0 (C5), 39.6 (C15); ESI-TOF-MS m/z 251.0386 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}$ 251.0373).

Série AS02109

Cette série contenait de la 6,7-diméthoxydirchromone (voir chapitre III) et la 8-hydroxy-7-méthoxydirchromone (**73**) (Figure 33), ainsi qu'un mélange de deux autres dirchromones. Les travaux de purification de ce mélange n'ont pas permis d'isoler ceux-ci, mais l'analyse attentive des spectres RMN du mélange laisse croire que l'une d'elles serait la 7-hydroxy-8-méthoxydirchromone.

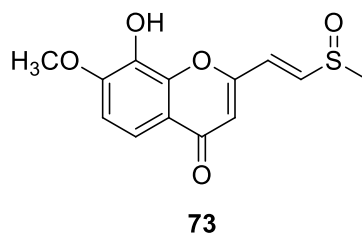


Figure 33. Structure de la 8-hydroxy-7-méthoxydirchromone.

La structure de la nouvelle dirchromone **73** a été déduite par comparaison avec les autres composés présentés au chapitre III. La substitution de l'aromatique a été confirmée par comparaison avec les données RMN de la flavone correspondante (Park et al., 2007).

8-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (73)

Poudre jaune amorphe; UV (IPA) λ_{max} (log ϵ) : 207 (4.439), 274 (4.070), inflexion 297 (3.906); IR ν_{max} (film) : 3380, 2955, 2925, 2854, 1736, 1634, 1611, 1583, 1517, 1462, 1403, 1379, 1327, 1289, 1209, 1158, 1118, 1093, 1037, 1009, 964, 810, 767; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.12 (d, $J=15.1$, H12), 7.47 (d, $J=8.3$, H5), 7.18 (d, $J=8.3$, H6), 6.99 (d, $J=15.1$, H11), 6.57 (s, H3), 3.93 (s, 7-OMe), 2.78 (s, H14); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 177.1 (C4), 158.2 (C2), 151.7 (C7), 145.2 (C9), 144.1 (C12), 134.6 (C8), 125.7 (C11), 118.0 (C10), 114.7 (C5), 111.4 (C3), 110.1 (C6), 56.3 (7-OMe), 39.7 (C14); ESI-TOF-MS m/z 281.0473 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_5\text{S}$ 281.0478).

Série AS02111

Cette série contenait de nouveau la dirchromone et la 6,7-diméthoxydirchromone, ainsi que la 6-hydroxy-7-méthoxydirchromone (**74**) (Figure 34).

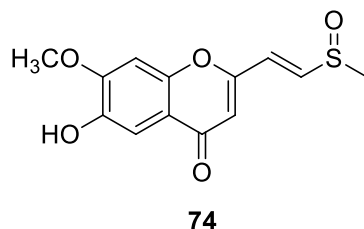


Figure 34. Structure de la 6-hydroxy-7-méthoxydirchromone.

La structure du composé **74** a été élucidée par comparaison avec les autres dirchromones. La substitution du cycle aromatique a été déduite par la présence de deux singulets aromatiques sans couplage *meta*, ce qui indiquait une substitution 6,7. Les positions respectives de l'hydroxy et du méthoxy ont été déterminées par la force relative des corrélations HMBC de H5 (assigné par corrélation HMBC avec C4) : les corrélations *meta* avec C9 et C7 (qui corréle avec le groupe

méthoxy) sont en effet plus intenses que la corrélation *ortho* avec C6. Malheureusement, aucune flavone ou chromone du même profil de substitution n'a été trouvée aux fins de comparaison. Il s'agit d'une nouvelle dirchromone.

6-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (74)

Poudre orange amorphe; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ) : 205 (4.389), 239 (4.071), 268 (3.912), 308 (3.735); IR ν_{\max} (film) : 3395, 2956, 2922, 2852, 1734, 1615, 1506, 1457, 1382, 1306, 1279, 1216, 1159, 1134, 1074, 973, 865, 833, 789, 755; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.92 (d, $J=15.2$, H12), 7.25 (s, H5), 7.09 (s, H8), 6.97 (d, $J=15.2$, H11), 6.54 (s, H3), 3.90 (s, 7-OMe), 2.76 (s, H14); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 176.3 (C4), 157.6 (C2), 154.2 (C7), 150.2 (C9), 146.0 (C6), 143.1 (C12), 125.8 (C11), 117.1 (C10), 111.3 (C3), 107.1 (C5), 100.1 (C8), 56.1 (7-OMe), 39.7 (C14); ESI-TOF-MS à obtenir en date du dépôt.

Série AS02114

Cette série a permis d'isoler quatre composés connus. Trois d'entre eux ont été identifiés par comparaison avec la littérature (RMN et indice de rotation): la 3,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**75**) (Inoshiri et al., 1986), le syringaldéhyde (**76**) (Itoh et al., 2010) et le (-)-pinorésinol (**78**) (Agrawal and Thakur, 1985; Cuenca et al., 1991) (Figure 35). Le sinapaldéhyde (**77**) a pour sa part été rapidement identifié par étude de son spectre RMN : l'aldéhyde très déblindé était aisément repérable. Il corrélait avec un alcène *trans*, lui-même lié à un cycle aromatique symétrique tétrasubstitué dont la substitution a été déterminée par HMBC.

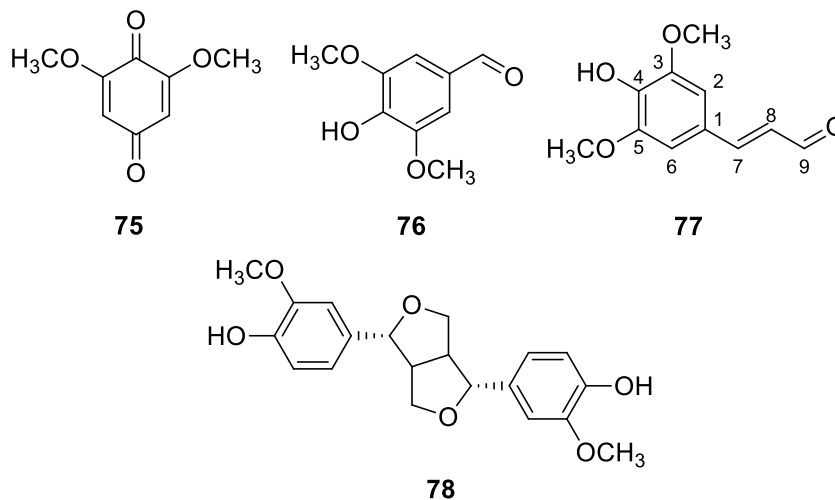


Figure 35. Structure de la 3,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**75**), du syringaldéhyde (**76**), du sinapaldéhyde (**77**) et du (-)-pinorésinol (**78**).

Sinapaldéhyde (**77**)

Poudre blanche amorphe; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 9.65 (d, $J = 7.8$, H9), 7.39 (d, $J = 15.7$, H7), 6.82 (s, H2, H6), 6.61 (dd, $J = 15.7, 7.8$, H8), 3.94 (s, 3-OMe, 5-OMe); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 193.5 (C9), 153.3 (C7), 147.3 (C3, C5), 138.0 (C4), 126.7 (C8), 125.5 (C1), 105.5 (C2, C6), 56.4 (3-OMe, 5-OMe).

Il est intéressant de souligner que le composé **75** a été isolé de la Thymelaeaceae *Wikstroemia lanceolata* et qu'il a montré une activité cytotoxique importante contre des cellules cancéreuses leucémiques (P-388) et colorectales (HT-29) (Lin et al., 2004). Quant au pinorésinol, sous la forme (\pm), il a montré une cytotoxicité modérée contre trois lignées cellulaires cancéreuses et des cellules endothéliales ombilicales (Chin et al., 2006).

Série AS02116

Cette série a permis d'isoler de nouveau du (-)-pinorésinol (**78**), ainsi que de la daphnorétine (**79**), identifiée d'après la littérature (Badawi et al., 1983; Cordell, 1984) (Figure 36). Ce composé a été identifié chez *D. occidentalis* et montrait une activité cytotoxique modérée contre des cellules cancéreuses leucémiques P-388 (Badawi et al., 1983).

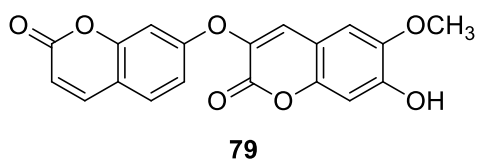


Figure 36. Structure de la daphnorétine.

Série AS02134

C'est dans cette série que des daphnanes ont été isolés et identifiés. Il s'agit de la huratoxine (**80**) et de la wikstrotoxine A (**81**), identifiées par comparaison avec la littérature (Wang et al., 2013). La fraction contenait également les nouveaux composés **82+83** et **84+85**, sous forme de mélanges racémiques, et baptisés respectivement octadécyldircanol et eicosyl-dircanol.

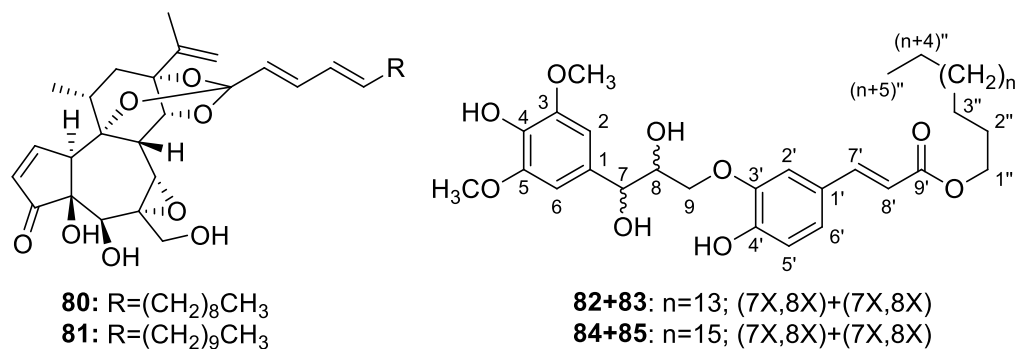


Figure 37. Structure de la huratoxine (**80**), de la wikstrotoxine A (**81**), et des mélanges racémiques d'octadécyl-dircanol (**82+83**) et d'eicosyl-dircanol (**84+85**).

Le mélange de composés **82+83** a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, avec un indice de rotation nul. Son analyse par ESI-TOF-MS a montré un ion pseudomoléculaire $[M+H-H_2O]^+$ à 641,4059, correspondant à la formule C₃₈H₅₈O₉ (calculé pour C₃₈H₅₇O₈ 641,4048). L'analyse par spectroscopie infrarouge montre la présence de groupements alcools (pic large et intense, 3476 cm⁻¹), d'un ester (pics intenses à 1710, 1274 et 1119 cm⁻¹) et de beaucoup de groupements alcanes (notamment trois pics intenses à 2952, 2918 et 2850 cm⁻¹). Les spectres RMN indiquaient la présence d'un cycle aromatique de type syringyl, mais un peu plus blindé que dans le cas du syringaldéhyde. Les protons H2 et H6 corrélaient avec C7 en HMBC. H7 forme un système de spin avec H8 et H9, indiquant un squelette de phénylpropanoïde. Les trois positions étaient oxygénées en raison de leur déblindage. Les doublets larges des protons H7' et H8', formant un alcène *trans*, corrélaient tous deux en HMBC avec le carbonyle C9'. H5' corrélait également avec C1', C3' et C6', faisant partie d'un cycle aromatique. H6' corrélait en COSY avec H5'. Ce second cycle était complété par deux carbones oxygénés : C4', avec ses corrélations en *méta* avec H2' et H6', et C3', corrélé en *méta* avec H5'. Les deux unités phénylpropanoïdes étaient liées par un pont éther entre H9 et C3', visible par une corrélation HMBC. Quant au carbonyle, il était impliqué dans un ester

avec le méthylène déblindé H1''. Ce dernier amorçait un système de spins s'étendant à H2'', H3'' puis un large et intense pic correspondant à une chaîne alkyle. Les protons terminaux de cette chaîne, H17'' et H18'' étaient pour leur part également visibles. Une méthanolyse d'un aliquot du composé, suivie d'une injection sur GC-MS, a indiqué la présence d'octadécanol, indiquant que la chaîne latérale était saturée et comptait 18 carbones, comme l'indiquait déjà la masse moléculaire de **82+83**. Ces informations permettent d'assigner à cette paire d'énantiomères la structure (*E*)-octadécyl 3-(3-(2,3-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)propoxy)-4-hydroxyphényl)-acrylate, ou plus simplement octadécylidircanol. La stéréochimie du diol C7-C8 reste à déterminer ultérieurement.

Octadécylidircanol (**82+83**)

Poudre blanche amorphe; UV (IPA) λ_{max} (log ϵ) : 209 (4.411), 244 (4.078), 300 (3.952), 323 (3.976); IR ν_{max} (film) : 3476, 3058, 2952, 2918, 2850, 1710, 1635, 1610, 1583, 1522, 1507, 1467, 1433, 1374, 1344, 1328, 1304, 1274, 1243, 1215, 1173, 1163, 1119, 1045, 981, 921, 899, 855, 839, 825, 814, 785, 734, 703; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.59 (d, $J = 15.9$, H7'), 7.18 (d, $J = 1.7$, H2'), 7.10 (dd, $J = 8.4, 1.7$, H6'), 6.97 (d, $J = 8.4$, H5'), 6.67 (s, H2, H6), 6.30 (d, $J = 15.9$, H8'), 4.95 (d, $J = 8.2$, H7), 4.18 (t, $J = 6.9$, H1''), 4.06 (ddd, $J = 8.2, 3.6, 2.5$, H8), 3.92 (s, 3-OMe, 5-OMe), 3.84 (dd, $J = 12.5, 2.5$, H9a), 3.56 (dd, $J = 12.5, 3.6$, H9b), 1.69 (quin, $J = 6.9$, H2''), 1.37 (m, H3''), 1.29 (m, H17''), 1.25-1.27 (m, H4'' to H16''), 0.88 (t, $J = 6.8$, H18''); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 167.3 (C9'), 147.3 (C3, C5), 145.2 (C3'), 144.0 (C7'), 143.9 (C4'), 135.4 (C4), 128.4 (C1'), 126.8 (C1), 122.2 (C6'), 117.4 (C2'), 116.7 (C5', C8'), 104.0 (C2, C6), 78.5 (C8), 76.5 (C7), 64.7 (C1''), 61.6 (C9), 56.4 (3-OMe, 5-OMe), 29.3-29.7 (C4'' to C16''), 28.7 (C2''), 26.0 (C3''), 22.7 (C17''), 14.1 (C18''); ESI-TOF-MS m/z 641.4059 $[\text{M}+\text{H}]^+ - [\text{H}_2\text{O}]$ (calc for $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{O}_8$ 641.4048).

Le mélange de composés **84+85**, isolé sous forme de résidu huileux incolore, avait également un indice de rotation nul. Toutes ses caractéristiques spectroscopiques étaient identiques à **82+83**, sauf pour la masse du composé et quelques légères différences de spectre infrarouge. L'analyse par ESI-TOF-MS montre que la molécule contient deux CH₂ supplémentaires ($m/z = 669.4377$ pour un fragment $[M+H]^+ - [H_2O]$, correspondant à C₄₀H₆₂O₉ (calculé pour C₄₀H₆₁O₈ 669.4361). La chaîne alkyle est donc plus longue de deux carbones. On obtient donc la structure (*E*)-eicosyl 3-(3-(2,3-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)propoxy)-4-hydroxyphényl) acrylate, ou eicosyldircanol. Encore là, la stéréochimie de C7 et C8 reste à déterminer.

Série AS02136

Cette série était une repurification du résidu après première ronde d'isolation de la précédente série. Elle a permis d'identifier la 5-hydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone (**86**) (Zahir et al., 1996) et le *trans*-3,3',5,5'-tétraméthoxystilbène (**87**) (Jo et al., 2011).

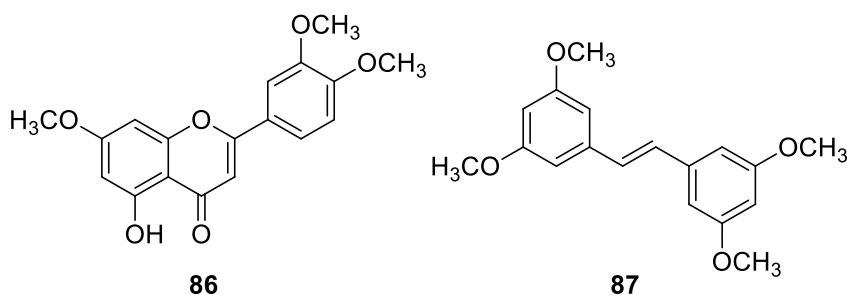


Figure 38. Structures de la 5-hydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone (**86**) et de la *trans*-3,3',5,5'-tétraméthoxystilbène (**87**).

En outre, quatre daphnanes ont été isolés. La prise de spectres RMN à 800 MHz au centre de RMN à haut champ du Québec et de l'Est du Canada de l'Université McGill n'a malgré tout pas

permis d'identifier ces derniers, trop peu abondants. Néanmoins, la présence d'une chaîne alkyle, d'un alcène terminal et d'un carbonyle α - β -insaturé α -méthylé montre qu'il s'agit bien de daphnanes.

Fractionnement et composés isolés à partir de la récolte de Québec

(travaux du baccalauréat)

L'extrait total au méthanol et méthanol/eau des écorces, racines et tiges de *Dirca* des marais a été suspendu dans de l'eau et extrait au CH_2Cl_2 . La fraction organique a été séparée en 9 fractions (A à I) sur colonne de gel de silice, en éluant avec un gradient CHCl_3 -MeOH. La fraction D a été solubilisée dans le méthanol et dégraissée à l'hexane par extraction liquide-liquide. Le résidu de la fraction méthanolique séchée a été fractionné en dix parties (D1 à D10) par chromatographie sur colonne de gel de silice, en éluant avec un gradient de CH_2Cl_2 -MeOH. Les trois lignanes présentés dans les sections précédentes (**70**, **71** et **78**) et le syringaldéhyde (**76**) ont été isolés de diverses fractions.

Les fractions D1 et D2 ont été réunies, et fractionnées en 11 sous-fractions (D1A à D1K) par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient hexane/AcOEt. La fraction D1H a été traitée par HPLC préparative et a permis d'obtenir la 6,7-diméthoxyflavone (**88**) (Figure 39). Celle-ci a été identifiée par comparaison directe avec le composé synthétique (Indofine Chemical Company).

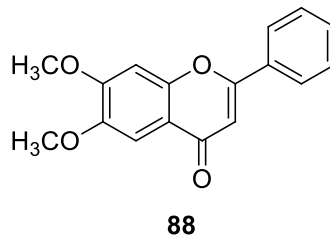


Figure 39. Structure de la 6,7-diméthoxyflavone.

La fraction D1K a été fractionnée en 8 sous-fractions par chromatographie basse pression sur gel de silice en éluant avec CH_2Cl_2 -AcOEt. L'une de celles-ci était principalement composée de 5-méthoxy-2-(2-méthoxyphényl)-4*H*-pyran-4-one (**89**), un nouveau composé montré à la Figure 40.

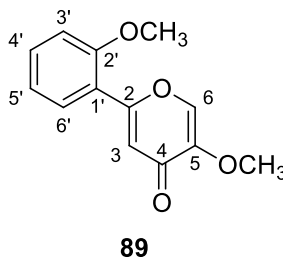


Figure 40. Structure de la 5-méthoxy-2-(2-méthoxyphényl)-4*H*-pyran-4-one.

Le composé **89** a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe. Son analyse par ESI-TOF-MS montrait un pic ionique pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de $m/z=233,0806$, indiquant la formule moléculaire $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4$: 233,0808). Le spectre infrarouge indique la présence d'une fonction carbonyle (1635 cm^{-1} , intense) et trois éthers (1263 , 1225 et 1175 cm^{-1} , intense). Les spectres RMN 1D montraient la présence de deux méthyles oxygénés, de six méthines sp^2 et de quatre carbones quaternaires, incluant le carbonyle. Les spectres COSY et ^1H ont permis de déterminer la présence d'un cycle aromatique *ortho* disubstitué, et constitué de $\text{H}3'$, $\text{H}4'$, $\text{H}5'$ et $\text{H}6'$. Les corrélations *méta* en HMBC entre $\text{H}3'$ et $\text{H}5'$ avec $\text{C}1'$, et $\text{H}4'$ et $\text{H}6'$ avec

C2', ont permis de compléter le cycle, avec un groupement méthoxy lié à C2'. Les corrélations HMBC des protons H6' et H3' avec C2 indiquent que celui-ci est lié à C1'. Les protons H3 et H6 corrélaient tous deux avec C2, mais seul H3 corréla également avec C1', ce qui permet d'assigner C3. Le singulet H3 corréla à son tour avec C3 et C5, et montre un déplacement chimique correspondant à la position α d'une cétone α,β -insaturée. Dès lors, en ajoutant le déblindage de C2, un cycle pyranone a été assigné. Le HMBC a finalement indiqué que le groupement méthoxy subsistant était lié à C5. C'est ainsi que la structure a été déterminée.

La structure paraît à première vue exotique. Néanmoins, des composés de structure analogue ont déjà été trouvés dans la nature. Par exemple, le composé parent (2-phényl-4H-pyran-4-one) a été isolé du champignon *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kokubo et al., 2011).

5-Méthoxy-2-(2-méthoxyphényl)-4H-pyran-4-one (89)

Poudre blanche amorphe; UV (IPA) λ_{\max} (log ϵ): 225 (4.281), 276 (4.237), 306 (4.033); IR ν_{\max} (film) : 3407, 3078, 3005, 2929, 2847, 1635, 1601, 1570, 1493, 1456, 1436, 1362, 1289, 1263, 1225, 1177, 1125, 1056, 1024, 979, 912, 868, 798, 759, 696, 604 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.20 (s, H6), 7.66 (dd, $J=7.7, 1.8$, H6'), 7.52 (td, $J=8.0, 1.8$, H4'), 7.21 (dd, $J=8.5, 1.7$, H3'), 7.10 (td, $J=7.6, 1.7$, H5'), 6.85 (s, H3), 3.88 (s, 2'-OMe), 3.70 (s, 5-OMe); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 172.8 (C4), 159.9 (C2), 157.0 (C2'), 147.7 (C5), 139.4 (C6), 132.5 (C4'), 128.8 (C6'), 120.7 (C5'), 119.6 (C1'), 114.7 (C3), 112.4 (C3'), 56.1 (5-OMe), 55.9 (2'-OMe); ESI-TOF-MS m/z 233.0806 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4$ 233.0808).

La fraction D4 a été fractionnée en dix sous-fractions (D4A à D4J) sur colonne de gel de silice avec un gradient de CH₂Cl₂-acétone. La sous-fraction D4G a été purifiée par HPLC préparative et a permis d'obtenir la 6,7-diméthoxydirchromone (voir section III).

La fraction D5 a été séparée en six sous-fractions (D5A à D5F) par chromatographie liquide basse pression sur gel de silice, avec un gradient CH₂Cl₂-acétone. La sous-fraction D5B purifiée par HPLC préparative a permis d'obtenir le *para*-hydroxy-phénéthyl-*trans*-férulate (**90**) (Darwish and Reinecke, 2003) et le nouveau composé 2-(2-hydroxyéthyl)-chromone (**91**), montrés à la Figure 41.

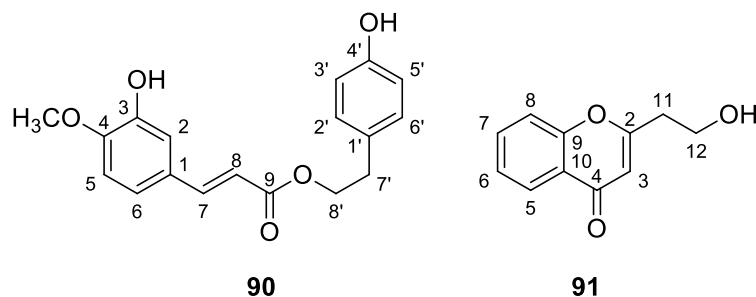


Figure 41. Structures du *p*-hydroxy-phénéthyl-*trans*-férulate (**90**) et la 2-(2-hydroxyéthyl)-chromone (**91**).

Le composé **91** a été obtenu sous forme de film jaune. Son analyse par ESI-TOF-MS a montré un pic pseudomoléculaire [M+H]⁺ à $m/z = 191,0703$, ce qui correspondait à la formule C₁₁H₁₀O₃ (calculé pour C₁₁H₁₁O₃ : 191,0703). L'analyse FTIR a montré que la molécule portait un alcool, par la présence d'un pic large et intense à 3370 cm⁻¹. Un carbonyle était également visible par une bande d'absorption intense à 1638 cm⁻¹. L'analyse des spectres RMN 1D montrait la présence de deux méthylènes, de cinq méthines et de quatre carbones quaternaires, dont un carbonyle. L'étude des spectres révélait la structure d'une chromone 2-substituée, comme pour les dirchromones, sans substitution sur l'aromatique. Le fort déblindage de C12 suggérait qu'il porte

la fonction alcool. H12 et H11 étaient dans le même système de spin, et les deux protons corrélaient en HMBC avec C2, fournissant la structure proposée.

2-(2-Hydroxyéthyl)-chromone (91)

Film jaune; UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) : 238 (3.420), inflexion 260 (3.216), 294 (3.215), 303 (3.197); IR ν_{max} (film) : 3370, 2956, 2924, 2853, 1712, 1638, 1603, 1574, 1516, 1465, 1391, 1219, 1121, 781, 759 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.16 (dd, $J=7.9, 1.4$, H5), 7.66 (td, $J=8.4, 1.4$, H7), 7.44 (d, $J=8.3$, H8), 7.38 (t, $J=7.8$, H6), 6.28 (s, H3), 4.06 (t, $J=6.1$, H12), 2.90 (t, $J=6.1$, H11); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 178.2 (C4), 166.7 (C2), 156.5 (C9), 133.6 (C7), 125.7 (C5), 125.1 (C6), 123.7 (C10), 117.9 (C8), 111.2 (C3), 59.5 (C12), 37.7 (C11); ESI-TOF-MS m/z 191.0703 [M+H]⁺ (calc. pour C₁₁H₁₁O₃ 191.0703).

La fraction D6 a été séparée en 9 sous-fractions sur chromatographie liquide basse pression en utilisant un gradient de CH₂Cl₂-acétone. L'une des fractions obtenues contient essentiellement l'amide équivalant à l'ester **90**, à savoir le (*E*)-3-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-N-(4-hydroxyphénéthyl)acrylamide (**92**) (Figure 42). La structure a rapidement été identifiée par comparaison des spectres RMN des composés **90** et **92**, et la présence de l'azote a été confirmée par une analyse ESI-TOF-MS montrant un pic pseudomoléculaire [M+H]⁺ à $m/z = 314,1381$ (calculé pour C₁₈H₂₀NO₄ 314.1387). Ce composé a déjà été identifié dans la nature, par exemple chez *Peperomia tetraphylla* (Li et al., 2012).

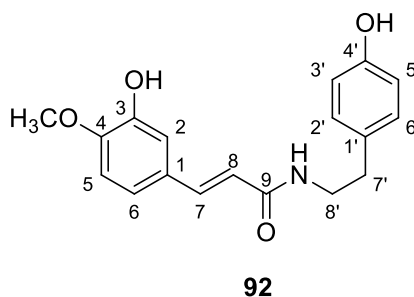
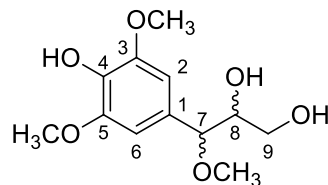


Figure 42. Structure du (*E*)-3-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-N-(4-hydroxyphénéthyl)acrylamide.

(*E*)-3-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-N-(4-hydroxyphénéthyl)acrylamide (92)

Poudre brune; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.86 (t, $J = 7.3$, NH), 7.18 (d, $J = 15.8$, H7), 6.96 (d, $J = 1.3$, H2); 6.86 (d, $J = 8.6$, H2' et H6'), 6.83 (dd, $J = 8.3, 1.3$, H6), 6.64 (d, $J = 8.3$, H5), 6.54 (d, $J = 8.3$, H3' et H5'), 6.30 (d, $J = 15.8$, H8), 3.65 (s, 4-OCH₃), 3.19 (td, $J = 7.30, 5.4$, H8'), 2.50 (t, $J = 7.30$, H7'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.5 (C9), 153.9 (C4'), 146.6 (C4), 146.2 (C3), 137.4 (C7), 128.2 (C1'), 128.1 (C2' et C6'), 125.1 (C1), 120.3 (C6), 117.8 (C8), 114.5 (C5), 114.0 (C3' et C5'), 109.6 (C2), 55.3 (4-OCH₃), 40.8 (C8'), 34.6 (C7'); ESI-TOF-MS m/z 314,1381 (calc. pour C₁₈H₂₀NO₄ 314.1387)).

La fraction D7 a été fractionnée en dix sous-fractions (D7A à D7J) par chromatographie liquide basse pression sur gel de silice, en éluant avec AcOEt-acétone. La fraction D7G a ensuite été purifiée par HPLC préparative pour fournir deux composés de type 7-méthoxysyringylglycérol (**93+94** et **95+96**) (Figure 43). Enfin, la fraction D7H repurifiée par HPLC préparative a fourni la 6-hydroxydirchromone (voir section III).



93+94: (7S,8S)+(7R,8R)

95+96: (7R,8S)+(7S,8R)

Figure 43. Structure des stéréoisomères du 7-méthoxysyringylglycérol.

L'analyse des données RMN du premier composé permet de déduire qu'il s'agit du *thréo*-8S-7-méthoxysyringylglycérol, pour lequel on rapporte un indice de rotation de +49,8 (Shi et al., 2010). La mesure d'un indice de rotation nul pour le composé suggère que nous sommes en présence d'un mélange racémique (composés **93+94**). L'analyse des données RMN légèrement différentes du second composé (Tableau 4) aboutit à la même structure. Cette fois encore, l'indice de rotation nul indiquait un mélange racémique de **95+96**. Il a donc été déduit qu'il s'agissait des énantiomères du diastéréoisomère de **93**. Les composés **94**, **95** et **96** sont nouveaux.

Tableau 4. Données RMN des deux diastéréoisomères de 7-méthoxysyringylglycérol (DMSO-d6).

Position	93+94		95+96	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm, <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm, <i>J</i> en Hz)
1	129.6		129.3	
2,6	104.7	6.52 (s)	105.3	6.53 (s)
3,5	147.8		147.6	
4	134.8		134.7	
7	84.2	3.99 (d, <i>J</i> =6.1)	84.2	3.97 (d, <i>J</i> =6.2)
8	75.2	3.49 (ddd, <i>J</i> =10.3, 6.1, 4.6)	74.3	3.57 (p, <i>J</i> =5.8)
9	62.5	3.23 (dt, <i>J</i> =10.3, 4.7), 3.11 (m)	62.8	3.42 (m), 3.35 (m)
3-OMe, 5-OMe	56.0	3.73 (s)	55.9	3.73 (s)
7-OMe	56.3	3.12 (s)	56.1	3.09 (s)

Activités biologiques des composés isolés

Cytotoxicité des composés phénoliques et des dirchromones

Tous les composés phénoliques ou soufrés isolés ont été soumis à des tests de cytotoxicité contre trois lignées cellulaires : l'adénocarcinome du poumon A-549, l'adénocarcinome colorectal DLD-1 et les fibroblastes cutanés sains WS-1. Les lignées de cellules malignes sélectionnées correspondent à deux types de cancers actuellement difficiles à traiter. Les tests ont été réalisés par la méthode Hoechst (Rago et al., 1990). Une partie des résultats est reprise au chapitre III, le composé le plus actif étant la dirchromone elle-même (IC_{50} de 1.0 μ M contre DLD-1). Les autres sont présentés dans le Tableau 5. La 3,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**75**) (IC_{50} de 17 μ M sur A-549), la 2-hydroxyéthylchromone (**91**) (IC_{50} de 20 μ M sur A-549) et les lignanes **71** et **78** (IC_{50} respectivement de 28 et 15 μ M sur A-549) sont les plus actifs. Cela dit, les composés phénoliques n'expliquent pas en totalité l'activité biologique observée pour les extraits de dirca des marais, beaucoup plus importante dès l'extrait brut.

La famille des dirchromones présente une légère sélectivité pour les cellules DLD-1 (de 1,6 à 9 fois plus cytotoxique sur DLD-1 que sur WS-1). Cette activité semble être corrélée avec la polarité des composés. Pour étayer cette hypothèse, les valeurs de logP théoriques des 8 dirchromones isolées ont été calculées par la méthode de la contribution des fragments (Ertl et al., 2000; Molinspiration, n.d.). Elles ont ensuite été mises en relation avec le logarithme des IC_{50} mesurés sur chaque lignée cellulaire (Figure 44). On retrouve une assez bonne corrélation entre les deux paramètres, ce qui suggère que des dirchromones moins polaires seraient plus cytotoxiques. Ce graphique met également en évidence une tendance à l'augmentation de la

sélectivité envers DLD-1 avec l'augmentation du caractère lipophile. De telles constatations pourraient être confirmées par une étude complète de relations structure-activité.

Tableau 5. Cytotoxicité des composés identifiés isolés de *Dirca palustris*, mesurée par le test de Hoechst

Composé	IC ₅₀ (μM) [†]		
	A-549	DLD-1	WS-1
Dircoxépine (72)	19,4 ± 0,3	12,7 ± 0,9	7 ± 4
8-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (73)	19 ± 1	16 ± 1	38 ± 7
6-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (74)	25 ± 3	17 ± 2	28 ± 3
2-Hydroxyéthylchromone (91) [*]	20 ± 3	>125	>125
Octadécyldircanol (82+83)	>125	>125	>125
Eicosyldircanol (84+85)	>125	>125	>125
3,5-Diméthoxy-1,4-benzoquinone (75)	17 ± 2	20 ± 2	26 ± 6
5-Méthoxy-2-(2-méthoxyphényl)-4H-pyran-4-one (89)	>125	>125	>125
7-Méthoxy-syringylglycérol (7S, 8S+7R, 8R) (93+94)	>125	>125	>125
7-Méthoxy-syringylglycérol (7S, 8R + 7R, 8S) (95+96)	>125	>125	>125
<i>para</i> -Hydroxy-phénéthyl- <i>trans</i> -férulate (90) [*]	>125	>125	>125
(<i>E</i>)-3-(3-Hydroxy-4-méthoxyphényl)-N-(4-hydroxyphénéthyl)acrylamide (92)	135 ± 21	61 ± 14	70 ± 24
5-Hydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone (86)	>125	123 ± 63	>125
6,7-Diméthoxyflavone (88)	>125	>125	>125
Daphnorétine (79)	>100	>100	>100
<i>trans</i> -3,3',5,5'-Tétraméthoxystilbène (87)	99 ± 12	>125	>125
Syringaldéhyde (76)	>125	>125	>125
Sinapaldéhyde (77)	81 ± 5	52 ± 5	196 ± 38
(-)-Laricirésinol (70)	>125	>125	>125
(±)-Syringarésinol (71) ^{**}	28 ± 4	>125	>125
(-)-Pinorésinol (78) ^{**}	15 ± 3	>125	>125
Étoposide (contrôle positif)	1,6 ± 0,3	1,0 ± 0,5	29 ± 25

^{*}Par manque de quantité, les résultats obtenus au baccalauréat sont repris tels quels, mais n'ont pas été obtenus lors de la même série de tests biologiques.

^{**}Ces composés ont fourni des IC₅₀ de >125 μM pour toutes les lignées lors du test réalisé en fin de maîtrise. Le tableau présente les résultats obtenus au baccalauréat avec les mêmes produits. Ces résultats sont davantage conformes à ce qui a été observé dans la littérature pour ces lignanes (Badawi et al., 1983; Chin et al., 2006).

[†]L'IC₅₀ est la concentration de composé à laquelle on observe 50% moins de cellules viables que lors d'un contrôle sans composé cytotoxique.

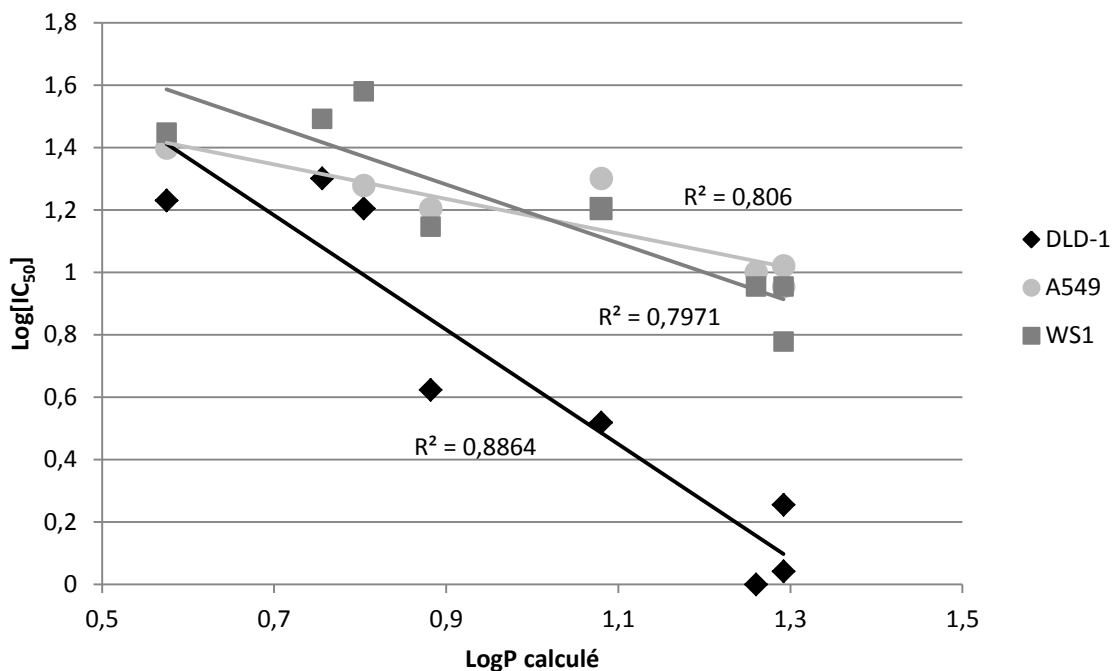


Figure 44. Relation entre le logP et la cytotoxicité des dirchromones pour chacune des lignées cellulaires étudiées.

Activités biologiques des daphnanes

Au moment de déposer le mémoire, les tests biologiques finaux sur la huratoxine, la wikstrotoxine A et les quatre daphnanes non-identifiés n'étaient toujours pas complétés en raison de problèmes techniques. Certaines observations peuvent toutefois être tirées de la littérature et du fractionnement bioguidé.

La huratoxine (**80**), un daphnane fréquemment retrouvé chez les Thymelaeaceae, est cytotoxique, mais aussi piscicide, irritante et procarcinogène (Hecker, 1977; Liao et al., 2009). Pour sa part, la wikstrotoxine A (**81**), moins fréquemment observée, seule son activité irritante a été rapportée (Liao et al., 2009).

La fraction dont les daphnanes ont été isolés a également fourni la 5-hydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone (**86**), le *trans*-3,3',5,5'-tétraméthoxystilbène (**87**) et les dircanols **82** à **85**. Aucun de ces derniers composés ne présente d'activité cytotoxique significative. Il est donc raisonnable de supposer que les daphnanes sont responsables de l'activité biologique observée tout au long du fractionnement bioguidé, surtout en regard de l'abondante littérature sur la forte cytotoxicité de nombreux membres de cette famille de composés (Liao et al., 2009).

Un phénomène particulier a été observé tout au long du fractionnement bioguidé. Les courbes dose-réponse des fractions contenant les daphnanes n'atteignaient jamais une mortalité complète des cellules. On remarquait en fait la présence de plateaux de survie à des niveaux variables, selon les essais, tel que montré à la Figure 45. Ce comportement laisse croire que les composés actifs contre A-549 sont cytostatiques plutôt que cytotoxiques. En effet, il est permis de croire que le plateau de survie correspond en fait à la quantité initiale de cellules introduites, dont la multiplication serait freinée par le composé sans entraîner de mortalité importante. Davantage de tests seront nécessaires pour étayer cette hypothèse.

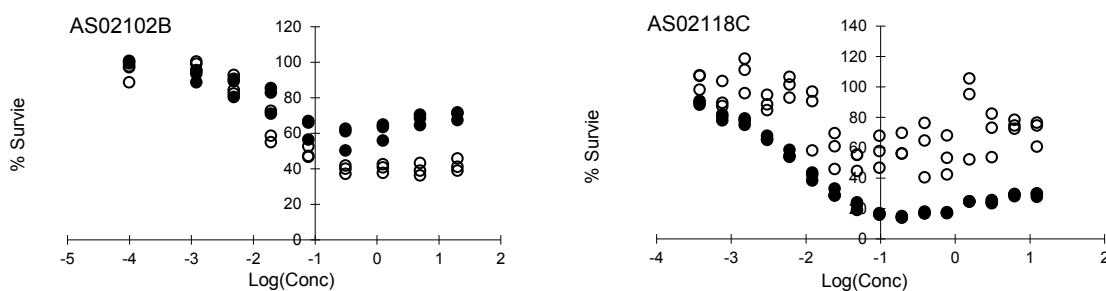


Figure 45. Courbes dose-réponse sur la lignée A-549 des fractions AS02102B et AS02118C, représentant les deux étapes précédant l'isolation des daphnanes. ● : Résazurine, ○ : Hoechst. La forte dispersion des points du test de Hoechst sur AS02118C a parfois été observée lors du fractionnement, sans être expliquée.

Activités antibactériennes

Tous les composés phénoliques et soufrés ont été soumis à des tests d'activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec une méthode de microdilutions modifiée (Banfi et al., 2003). Seules les dirchromones ont fourni des résultats positifs mais faiblement actifs (Tableau 6). Contrairement à l'activité cytotoxique, l'activité antibactérienne ne semble pas être liée à la polarité des dirchromones. On remarque à l'inverse que la substitution de la position 7 par un méthoxy inhibe l'activité contre *S. aureus*. Quant à l'activité antibactérienne contre *E. coli*, elle est faible pour les composés **2** et **3**, et disparaît après 24 h d'incubation. Il n'est cependant pas possible de tirer beaucoup de conclusions à partir du nombre restreint de composés testés. Une étude de relation structure-activité plus systématique permettrait de mieux cerner ce qui influence l'activité antibactérienne.

Tableau 6. Activité antibactérienne des composés soufrés isolés de *Dirca palustris*.

Composé	MIC ₉₀ (µM)**			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Incubé 6 h	Incubé 24 h	Incubé 6 h	Incubé 24 h
Dirchromone (1)*	15.6	15.6	>62.5	>62.5
6-Hydroxydirchromone (2)*	15.6	31.3	62.5	>62.5
6-Méthoxydirchromone (3)*	7.8	15.6	31.3	>62.5
7-Méthoxydirchromone (4)*	15.6	31.3	>62.5	>62.5
6,7-Diméthoxydirchromone (5)*	62.5	62.5	>62.5	>62.5
7,8-Diméthoxydirchromone (6)*	62.5	62.5	>62.5	>62.5
Dircoxépine (72)	>50	>50	>50	>50
8-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (73)	>50	50	>50	>50
6-Hydroxy-7-méthoxydirchromone (74)	>50	50	>50	>50
Gentamycine (témoin positif)	0.0211	0.0843	0.0843	0.169

*Résultats reproduits du chapitre III aux fins de comparaison, mais testés séparément des autres composés. Les numéros de structures sont ceux indiqués au chapitre III.

**Le MIC₉₀ est la dilution de composé testée à laquelle on observe au minimum 90% moins de bactéries viables que lors d'un contrôle sans composé antibactérien.

CHAPITRE V

AVANCEMENT DES TRAVAUX DE SYNTHÈSE DES DIRCHROMONES

Il n'a pas été possible d'obtenir les produits synthétiques souhaités (Figure 46) dans le cadre de ce projet de maîtrise. En effet, puisque cet aspect du projet n'était pas prioritaire, le temps pour le mener à bien a manqué. Cela ne permet pas d'évaluer les relations structure-activité des dirchromones. Plusieurs voies synthétiques ont cependant été explorées. Ces résultats précisent les pistes à suivre si d'autres avaient à s'attaquer à cette synthèse ultérieurement.

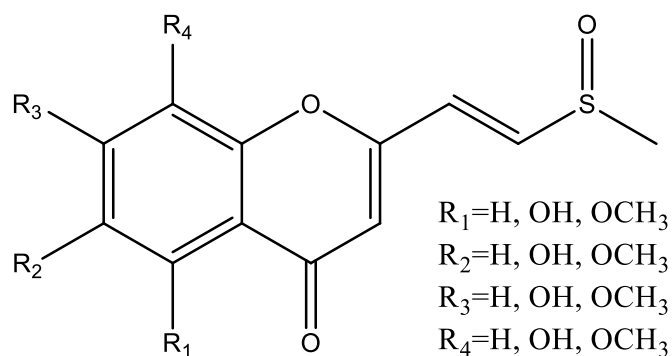


Figure 46. Structures visées par l'aspect synthétique du projet de maîtrise. Tous les dérivés mono- et di-substitués possibles sont ciblés.

Couplage de Heck

Chaîne soufrée

Les premiers efforts de synthèse ont été dirigés vers l'obtention d'un substrat adéquat à la réalisation d'un couplage de Heck. Selon cette approche, une chromone munie d'un groupe partant en position 2 et le méthylsulfinyléthène étaient nécessaires, ni l'un ni l'autre n'étant commercialement offert.

La première approche envisagée pour la synthèse du méthylsulfinyléthène se déroulait en deux étapes à partir du diméthyldisulfide. L'intermédiaire de chlorure de méthylsulfinyle est

instable et offre peu de possibilités pour la détection RMN. Comme le rendement rapporté dans la littérature était de 95 % pour la première étape (Youn and Herrmann, 1986), l'intermédiaire a été utilisé sans purification pour la suite lors du premier essai (Figure 47).

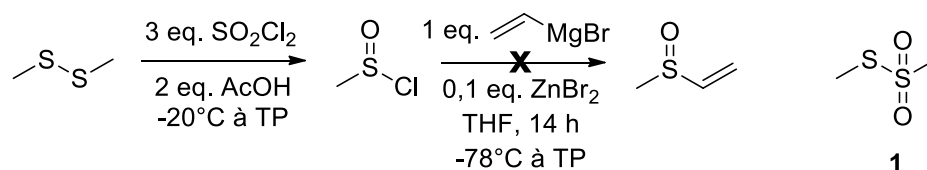


Figure 47. Premier essai de synthèse du méthylsulfinyléthène.

Le milieu réactionnel a été soumis à une partition liquide-liquide entre de l'eau saturée en chlorure d'ammonium et de l'acétate d'éthyle. La phase organique a été filtrée sur une mince couche de gel de silice. Cette dernière a été lavée avec du dichlorométhane. Après évaporation de l'éluat, un liquide brun-roux a été obtenu. La comparaison de la RMN de ce produit brut avec la littérature (Cubbage et al., 2001b; Li and Liu, 2007) n'a pas permis d'identifier le produit voulu. Par GC-MS, le pic majoritaire semblait davantage correspondre au produit **1**.

La première étape a donc été reprise seule, sous argon et en présence de tamis moléculaires activés pour éviter toute perturbation provenant de l'air ou de l'humidité. Après évaporation du chlorure d'acétyle sous pression réduite, le produit a été injecté sur GC-MS à nouveau. Encore une fois, le produit majoritaire correspond d'après la banque de données de spectrométrie de masse au produit **1**. Toutefois, l'analyse par RMN du même produit ne montrait qu'un seul carbone, ce qui n'était pas compatible avec la structure **1**.

Afin de cerner la structure du produit non identifié et détecté par chromatographie gazeuse, il a été envisagé d'effectuer la méthanolyse du chlorure de méthylsulfinyle afin d'obtenir le

composé **2** mieux caractérisable, tel que montré à la Figure 48. L'analyse par RMN des produits de la réaction de méthanolyse montre des traces du composé **2**, mais ne permet pas d'identifier le composé majoritaire formé. La tentative de méthanolyse n'a donc pas réellement aidé à l'identification des produits de la réaction de formation du chlorure de méthylsulfinyle.

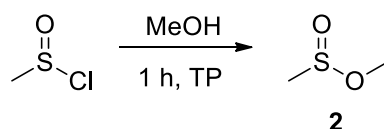


Figure 48. Estérification de l'intermédiaire méthoxylé pour vérifier l'obtention du chlorure de méthylsulfinyle.

Des voies alternatives ont donc été envisagées. La première consistait à remplacer l'acide acétique par de l'hexaméthylidisiloxane ((TMS)₂O, Figure 49) (Drabowicz et al., 2003). Après méthanolyse du produit de réaction, l'analyse RMN montrait bel et bien un pic de groupement méthoxy. Toutefois, il était possible que ce dernier soit dû à la production de méthoxytriméthylsilane. Après une seconde synthèse à plus grande échelle, une vérification par GC-MS a montré qu'environ 60 % du mélange final était constitué de chlorure de méthylsulfinyle.

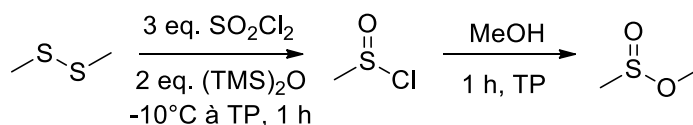


Figure 49. Deuxième tentative de synthèse du chlorure de méthylsulfinyle.

Le couplage de ce chlorure avec le bromure de vinylmagnésium a ensuite été tenté à plusieurs reprises, avec ou sans catalyseur de ZnBr₂ et avec différents temps de réaction. Cependant, les analyses GC-MS des produits obtenus n'ont jamais montré plus que des traces de

méthylsulfinyléthène. Compte tenu des résultats mitigés obtenus, cette approche a donc été abandonnée.

Au lieu d'obtenir d'abord le sulfoxyde, une stratégie alternative consistait à se concentrer avant tout sur l'alcène. Une fois celui-ci obtenu, le sulfoxyde pouvait être produit par oxydation douce d'un sulfide tel que montré à la Figure 50 (Cubbage et al., 2001b).

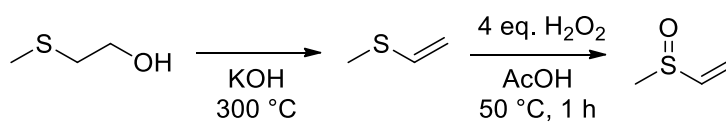


Figure 50. Synthèse du méthylsulfinyléthène par déshydratation et oxydation.

Le méthylthioéthanol est déshydraté dans du KOH fondu, générant le vinyle à l'état gazeux. Un montage spécial était requis pour cette procédure, tel qu'illustré à la Figure 51. Un flux continu d'argon poussait le gaz (une vapeur blanche visible) vers deux trappes à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ successives afin de limiter le plus possible les pertes. Le réactif initial y a été ajouté goutte à goutte et le chauffage s'est poursuivi jusqu'à ce que le gaz cesse d'être généré.

Le liquide final obtenu contenait à la fois du méthylthioéthanol et le méthylthioéthène recherché. L'oxydation de ce mélange avec du peroxyde d'hydrogène, suivie d'une neutralisation avec NaOH 3M et d'une reprise dans le dichlorométhane, a fourni un ratio 1:1 du méthylsulfinyléthène et du produit de départ.

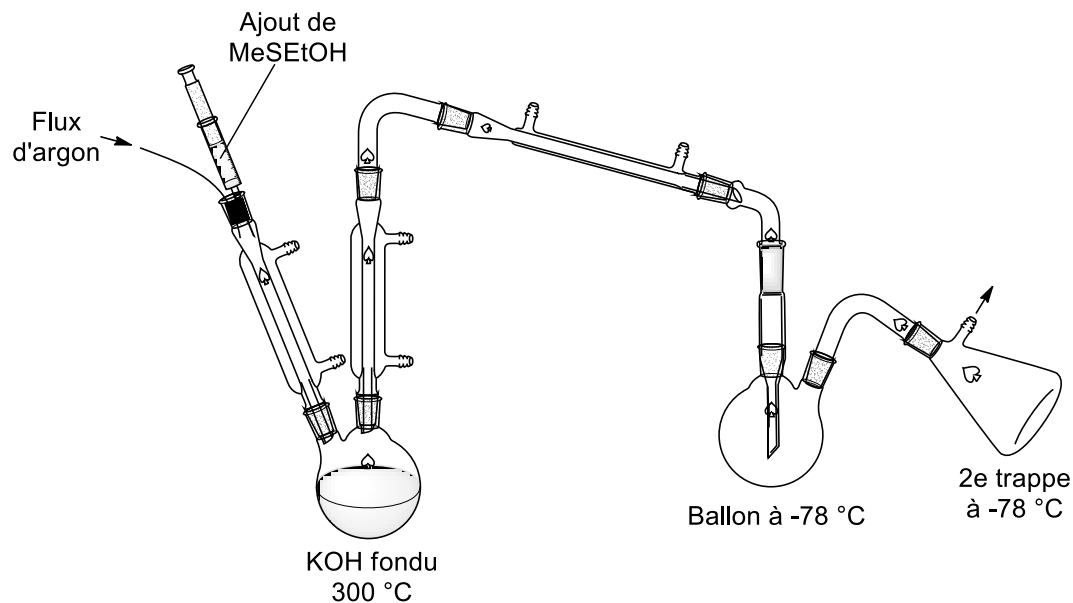


Figure 51. Montage expérimental nécessaire à la déshydratation du méthylthioéthanol sur KOH fondu.

Cependant, les quantités obtenues étaient faibles (<1 mL). La répétition de l'expérience à plus grande échelle n'a fait qu'augmenter la quantité de produit de départ n'ayant pas réagi. Le KOH fondu a également attaqué le verre du ballon 2 cols, devenu mince comme du papier. Cette réaction a donc également été mise de côté.

Néanmoins, la génération de l'alcène sans passer par le sulfoxide demeurait une voie intéressante. Une méthode ayant recours à l'acétylène permet de l'obtenir à partir du diméthyldisulfide (Trofimov et al., 2004). Selon cette approche, le diméthyldisulfide est clivé en milieu réductif basique en présence d'hydrate d'hydrazine et d'acétylène (Figure 52).

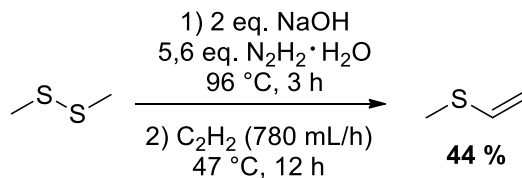


Figure 52. Production du méthylvinylsulfide par alkylation du diméthyldisulfide.

Une phase plus dense que l'eau contenait le produit final. La phase aqueuse a été extraite à l'éther diéthylique pour obtenir davantage de produit. L'éther a ensuite été retiré par distillation pour obtenir un liquide transparent. Tant le RMN que l'analyse par GC-MS ont montré que ce produit était bien le méthylvinylsulfide. Le rendement de 44 %, comparativement à près de 80 % dans l'article original, peut s'expliquer par l'instabilité du flux d'acétylène, qui ne s'est pas poursuivi toute la nuit. Cette dernière réaction a donc permis d'obtenir une chaîne soufrée propice à un couplage de Heck.

2-Halogénochromone

Quelques tentatives infructueuses de conversion de la 4-hydroxycoumarine en chromone 2-substituée susceptible d'être convertie en halogénure ont été tentées. Néanmoins, cette approche comprenait des failles théoriques inhérentes qui nous ont obligé à l'écartier. Les efforts se sont plutôt concentrés sur une méthode de cyclisation à partir d'un phénol (Levas and Levas, 1960). Après quelques essais infructueux, celle-ci a été modifiée pour faire directement une acylation de Friedels-Craft au lieu de passer par la migration de Fries, ce qui permettait d'économiser une étape (Figure 53).

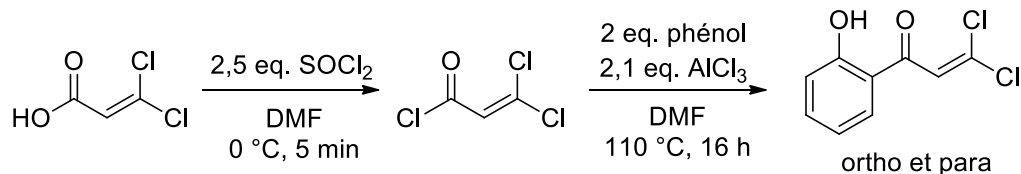


Figure 53. Procédure modifiée pour l'acylation du phénol en vue de le cycliser en 2-chlorochromone.

Comme le chlorure d'acyle était utilisé immédiatement, seul le produit final a été analysé. Après extraction liquide-liquide eau/dichlorométhane, la phase organique a été séchée et séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient toluène-acétate d'éthyle. L'analyse de toutes les fractions obtenues par RMN n'a pas permis d'identifier le produit voulu, ni son isomère para.

Comme le problème pouvait venir du chlorure d'acyle, ce dernier a été préparé de manière différente (Stack and Coates, 1984) (Figure 54) et analysé avant de passer à l'acylation. Les données RMN obtenues pour la solution hexanique de chlorure d'acyle ont montré un déplacement notable des signaux ^{13}C par rapport au substrat initial. Ce test a donc été jugé concluant, et le chlorure d'acyle était dans ce cas produit quantitativement selon les spectres obtenus.

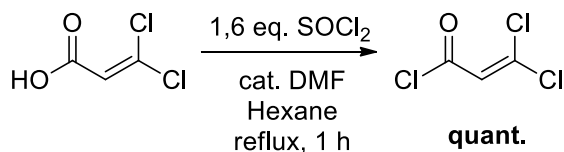


Figure 54. Conditions modifiées pour générer le chlorure d'acyle.

L'acylation de Friedels-Craft subséquente a été réalisée dans l'acétate de butyle plutôt que dans le diméthylformamide, et ce afin d'être compatible avec la solution hexanique de chlorure

d'acyle. Après 6 h, deux produits moins polaires que le phénol et ayant un Rf similaire étaient visibles par CCM. La phase organique issue de l'extraction liquide-liquide entre l'eau saturée en chlorure d'ammonium et l'acétate d'éthyle a été évaporée sous pression réduite. L'analyse par GC-MS de cette fraction a montré un pic pouvant correspondre au dichloroacrylylphénol. La récupération des principaux produits par HPLC préparatif, suivi de l'analyse de ces derniers par RMN, n'a toutefois pas permis d'isoler le produit voulu. L'acylation a été retentée en utilisant de l' AlCl_3 neuf, le précédent montrant des signes de dégradation. Néanmoins, les résultats n'ont pas été plus concluants.

Puisque l'acylation directe semblait poser problème, la migration de Fries a été reconsidérée. Pour maximiser les rendements de l'estérification, le phénol a été converti en phénolate avant réaction (Figure 55).

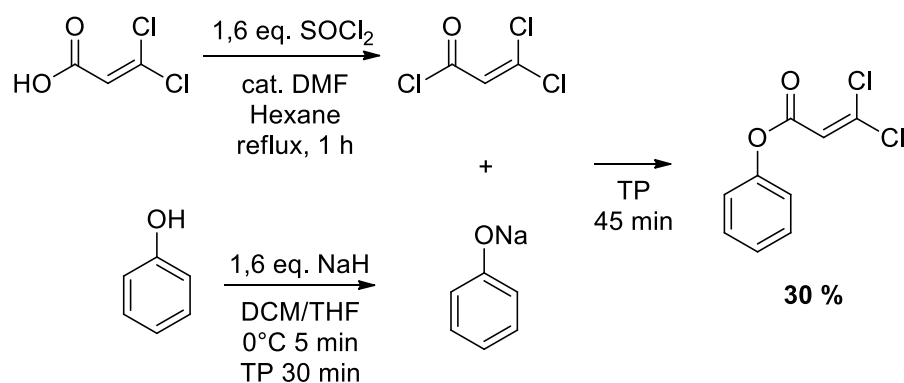


Figure 55. Synthèse de l'ester acrylique en vue de la migration de Fries.

Le produit de réaction a été lavé à l'eau. La phase organique a été séchée et le produit brut a été séparé par chromatographie « flash » sur gel de silice avec hexane/dichlorométhane 9:1, 4:1 et 2.33:1. Le premier produit élué était l'ester recherché, néanmoins obtenu en assez faible rendement. La même estérification sans activation du phénol en phénolate était rapportée avec

des rendements de 88-92 % (Levas and Levas, 1960). Les essais effectués dans ces conditions ont montré des rendements médiocres (<2 %). Des tests ultérieurs ont démontré que cela pouvait être dû à la mauvaise qualité du SOCl_2 , qui montrait des signes de dégradation par l'humidité. Une faille dans le maintien des conditions anhydre pourrait aussi être en cause.

Quelques tentatives supplémentaires ont par la suite été réalisées pour une acylation de Friedels-Craft en utilisant du chlorure d'oxalyle plutôt que le SOCl_2 potentiellement dégradé. L'un de ces tests a montré que l'acétate de butyle semblait générer des sous-produits butylés, d'après les études de fractions brutes par GC-MS. Ce solvant a donc été remplacé par du toluène (Figure 56). En outre, les étapes d'extraction liquide-liquide ont été supprimées pour éviter toute perte de produit dans une émulsion.

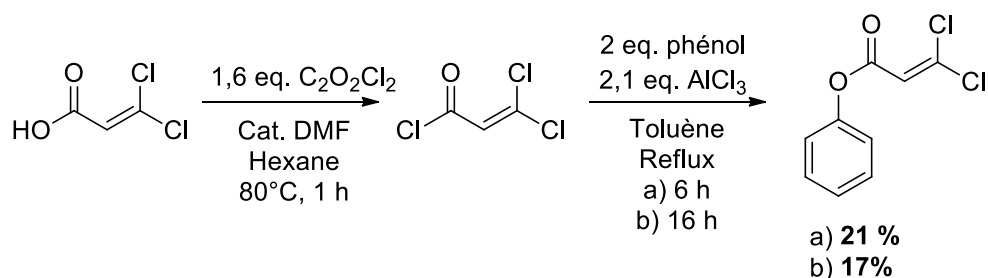


Figure 56. Conditions modifiées pour l'acylation de Friedels-Craft.

Deux essais de cette réaction n'ont pas permis d'obtenir le produit d'acylation. Seul l'ester a été isolé par chromatographie, et le rendement était moins bon qu'avec l'estérification directe du phénolate (Figure 55). L'acylation de Friedels-Craft a donc été définitivement écartée à partir de ce point.

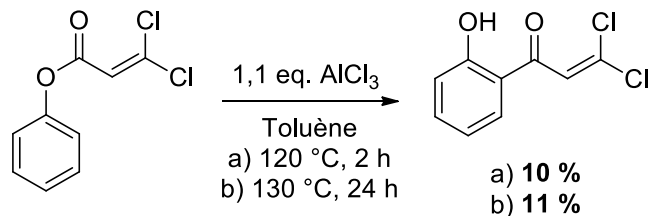


Figure 57. Migration de Fries pour obtenir un phénol cyclisable en chromone 2-halogénée.

Puisque l'ester avait été obtenu aux étapes précédentes avec une bonne pureté, une migration de Fries a ensuite été tentée (Figure 57). Le résidu sec obtenu après évaporation du toluène a été purifié par chromatographie sur silice, en éluant isocraquement avec hexane/dichlorométhane 3:1. L'isomère ortho a bel et bien été obtenu, mais avec un faible rendement (10 %). L'utilisation de conditions plus agressives n'a pas produit de différence significative à cet égard. Ce résultat diffère encore du rendement rapporté dans la littérature de 43 % dans des conditions similaires (Levas and Levas, 1960).

La cyclisation de la phénone en chromone s'est faite par ajout graduel de NaOH dilué à une suspension aqueuse du produit initial (Figure 58). Le produit est aisément séparé sur une mince couche de gel de silice en lavant successivement avec hexane, hexane/dichlorométhane 1:1 puis dichlorométhane pur. Néanmoins, le rendement de 65 % est encore inférieur au rendement rapporté de 83-88 % (Levas and Levas, 1960).

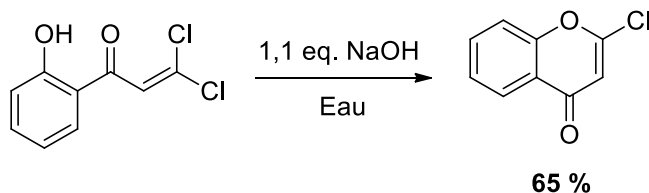


Figure 58. Cyclisation de la phénone en chromone par ajout lent de NaOH dilué.

Couplage de Heck

Le couplage de Heck, réalisé avec des conditions inspirées de la littérature (Lee et al., 2011) et tel qu'illustré à la Figure 59, n'a pas permis d'obtenir le produit désiré. L'hydrolyse basique de la 2-halogénochromone était rapportée par Levas and Levas, 1960, en présence de NaOH 1N. Il semble que même si la base était 3,5 fois plus diluée, cette hydrolyse a probablement quand même eu lieu. Sans que le produit de réaction puisse être identifié, il ne s'agissait pas du produit de couplage.

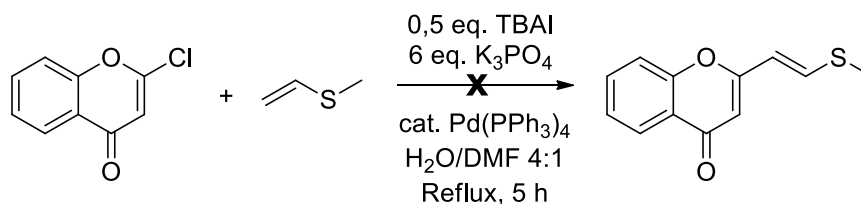


Figure 59. Conditions utilisées pour le couplage de Heck.

Les couplages de Heck se déroulant forcément en condition basique, cette voie de synthèse était compromise. Un second test effectué avec seulement 2 équivalents de K_2CO_3 , une base plus douce, a donné le même résultat et confirmé le problème. Les rendements faibles obtenus pour les étapes préalables ont contribué à écarter cette voie de synthèse.

Réaction de Wittig

L'alternative la plus prometteuse au couplage de Heck consistait à procéder à une réaction de Wittig pour générer l'alcène latéral de la dirchromone. Les deux produits de départ sont commerciaux, mais l'halogénométhylsulfonyleméthane est rare et dispendieux. Il a donc été

nécessaire de trouver une manière de le produire au laboratoire. Quant à l'acide chromone-2-carboxylique, il doit être réduit à l'aldéhyde avant le couplage.

Une méthode très simple a été trouvée pour générer le réactif soufré (Tsuchihashi and Ogura, 1971). Elle consiste à halogéner directement du DMSO avec du N-chlorosuccinimide en présence de base (Figure 60). L'étude par RMN DEPT-135 du produit brut, après évaporation du dichlorométhane, montre l'apparition d'un CH₂ à 58.4 ppm correspondant au carbone chloré.

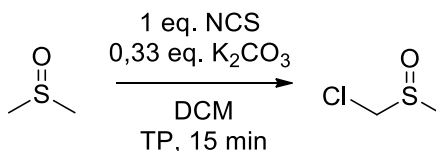


Figure 60. Chloration du DMSO en condition basique.

Le rendement n'a pu être évalué, bien qu'il semblait être excellent. En effet, la purification de cette réaction passait par une distillation. Vu les points d'ébullition très élevés des produits soufrés, celle-ci doit se dérouler à pression très réduite, autour de quatre millibars selon la littérature. Puisqu'une telle pression était difficile à atteindre au laboratoire, la manipulation a été remise à plus tard.

La réduction de l'acide chromone-2-carboxylique en chromone-2-carboxaldéhyde procède en trois étapes : une estérification, une réduction à l'alcool et une oxydation douce à l'aldéhyde. Une estérification en présence de chlorure de triméthylsilyle dans du méthanol a été réalisée (Brook and Chan, 1983), puis le mélange réactionnel a été neutralisé avec du méthanolate de sodium (5 %) dans du méthanol. La solution a été séchée sous pression réduite, puis le résidu a été mis en suspension dans l'éther diéthylique et filtré sur une mince couche de gel de silice en

utilisant l'éther diéthylique comme éluant. L'ester a ainsi été obtenu avec plus de 99 % de rendement (Figure 61).

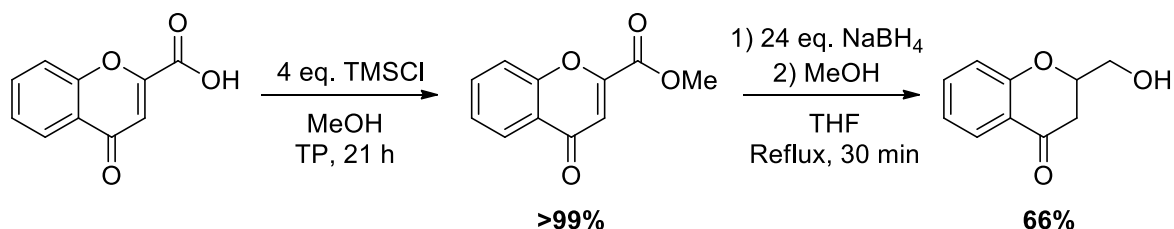


Figure 61. Tentative de réduction de l'acide carboxylique après estérification.

La réduction de cet ester en alcool a été tentée avec $\text{NaBH}_4\text{-MeOH}$ (da Costa and Pais, 2006). Toutefois, la réaction ne s'est pas déroulée comme prévu. Après une neutralisation avec une solution de NH_4Cl à saturation dans l'eau et une extraction liquide-liquide, l'analyse du produit brut par RMN indique que la réduction a transformé la chromone en chromanone. Outre le produit indiqué sur la figure, un autre était présent à environ 33 %, mais il ne portait pas davantage de liaison alcénique. Bref, la réduction était trop agressive. C'est peu surprenant considérant une erreur de calcul ayant fait passer de 6 à 24 le nombre d'équivalents d'hydrure utilisés.

Le temps a manqué pour faire davantage d'essais. Néanmoins, les conditions de la réduction pourraient raisonnablement être ajustées : une diminution du nombre d'équivalents d'hydrure, de la température et du temps pourraient éviter la réduction de l'alcène. Cette réaction a déjà été rapportée par le groupe de Helguera et al., 2013, sur un substrat similaire. Cette dernière source expose par ailleurs une voie intéressante à explorer si le projet devait être repris (Figure 62). L'utilisation de phénones comme substrats de départ permettrait en effet de générer le patron de substitution souhaité pour le noyau aromatique avant de synthétiser la dirchromone.

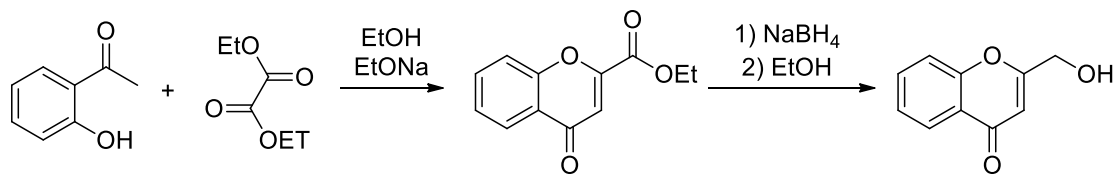


Figure 62. Synthèse de la 2-hydroxyméthylchromone par cyclisation d'une phénone et réduction d'ester (Helguera et al., 2013).

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal du projet d'étude de la cytotoxicité de *Dirca palustris*, qui consistait à identifier des composés responsables de l'activité, a été atteint en bonne partie. En effet, le fractionnement bioguidé a permis d'identifier deux orthoesters de daphnanes, la huratoxine et la wikstrotoxine A, en plus de daphnanes n'ayant pas pu être caractérisés faute de quantité. La huratoxine est un composé à la cytotoxicité et aux effets irritants déjà connus. Sa présence peut en partie expliquer l'activité biologique importante des extraits de dirca des marais observée *in vitro*, ainsi que la toxicité rapportée dans la littérature pour cette plante. L'identification de diterpènes de la famille des daphnanes chez *Dirca palustris* n'est pas surprenante, puisqu'on en trouve également chez *Dirca occidentalis* et chez les Thymelaeaceae en général. L'activité biologique exacte de l'ensemble des diterpènes isolés aura à être évaluée dans un avenir rapproché, notamment en ce qui concerne une possible activité cytotatique plutôt que cytotoxique. Néanmoins, l'intérêt de ces résultats est essentiellement théorique. Les très faibles quantités de daphnanes présents ne permettent pas d'envisager une extraction à grande échelle dans la perspective de développer un médicament. Avec les connaissances actuelles, la complexité des structures ne permet pas davantage de développer une méthode de production synthétique efficace pour les daphnanes.

Ce projet a aussi été l'occasion d'améliorer significativement les connaissances phytochimiques au sujet du dirca des marais, en s'attardant à des métabolites secondaires peu abondants. Au total, 33 composés phénoliques, diterpéniques ou soufrés ont été isolés et caractérisés, tous rapportés pour la première fois chez *D. palustris*. De ce nombre, 20 produits sont de nouvelles molécules jamais rapportées dans la littérature. Le projet a permis de mettre en lumière la grande diversité de classes chimiques présentes chez cette espèce. Plusieurs

découvertes supplémentaires pourraient fort probablement être faites en étudiant des composés plus abondants présents dans les extraits au dichlorométhane de *dirca*.

L'identification de métabolites secondaires soufrés constitue notamment une découverte phytochimique importante. Les dirchromones et la dircoxépine ont une structure originale et sans parenté avec les autres composés soufrés connus chez les plantes. Il s'agit de la première mention de tels composés chez les Thymelaeaceae. Tant d'un point de vue chémotaxonomique que biosynthétique, il serait intéressant de rechercher des molécules analogues chez d'autres espèces de cette famille. Le déploiement d'efforts en ce sens doit être d'autant plus encouragé que les dirchromones présentent des activités biologiques *in vitro* intéressantes et une structure de base originale. Elles témoignent de l'importance de soutenir les efforts de recherche dans le domaine des produits naturels, en quête de nouvelles structures moléculaires à étudier dans le domaine thérapeutique.

L'un des objectifs secondaires de ce projet consistait à procéder à la synthèse totale des dirchromones en vue de procéder à une étude de relation structure-activité. Cet aspect n'a pas abouti aux résultats escomptés, en raison de différents problèmes inhérents aux voies de synthèse envisagées. Un plan de synthèse reposant sur un couplage de Wittig à partir de phénones semble être l'option à privilégier pour atteindre cet objectif dans l'avenir. L'obtention de dirchromones synthétiques permettrait de contourner l'obstacle posé par leur présence en très faibles quantités dans les extraits de *dirca* des marais. La préparation de plusieurs analogues pourrait également permettre d'optimiser les activités biologiques observées jusqu'à justifier des études *in vivo*, notamment pour la dirchromone dont l'IC₅₀ de 1.0 µM sur l'adénocarcinome colorectal pourrait déjà justifier un test sur des souris porteuses de tumeurs C'est donc sans doute du côté de la

synthèse que résident les meilleures chances de passer de la recherche au développement préclinique à la suite du présent projet.

RÉFÉRENCES

- Abrams, L.R., Ferris, R.S., 1951. An Illustrated Flora of the Pacific States: Geraniaceae to Scrophulariaceae, Geraniums to Figworts, Illustrated Flora of the Pacific States. Stanford University Press, Stanford (CAL).
- Agrawal, P.K., Thakur, R.S., 1985. ¹³C NMR Spectroscopy of Lignan and Neolignan Derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 23, 389–418.
- Ariga, T., Seki, T., 2006. Antithrombotic and Anticancer Effects of Garlic-Derived Sulfur Compounds : A Review. *BioFactors* 26, 93–103.
- Babayan, K.N., Avakyan, L.S., Karapetyan, R.G., Chukhadzhyan, G.A., 1985. Dehalogenation of Organic Halides in the Presence of Phase-Transfer Catalysts. IV. Dehalogenation of Styrene and Ethylene Halides. *Armenian Journal of Chemistry* 38, 201–204.
- Badawi, M.M., Handa, S.S., Kinghorn, A.D., Cordell, G.A., Farnsworth, N.R., 1983. Plant anticancer agents XXVII: Antileukemic and Cytotoxic Constituents of *Dirca occidentalis* (Thymelaeaceae). *J. Pharm. Sci.* 72, 1285–1287.
- Banfi, E., Scialino, G., Monti-Bragadin, C., 2003. Development of a Microdilution Method to Evaluate Mycobacterium tuberculosis Drug Susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 796–800.
- Barluenga, J., Alonso-Cires, L., Campos, P.J., Asensio, G., 1983. Mercury(II) Oxide/Tetrafluoroboric Acid: Enhanced Alkylating Ability of Alkyl Bromides: a General Synthesis of Alcohols and Ethers. *Synthesis (Stuttg.)* 53–55.
- Beletskaya, I.P., Cheprakov, A. V., 2000. The Heck Reaction as a Sharpening Stone of Palladium Catalysis. *Chem. Rev.* 100, 3009–3066.
- Bigelow, J., 1818. *American Medical Botany*. Cummings and Hilliard, Boston.
- Borris, R.P., Blasko, G., Cordell, G.A., 1988. Ethnopharmacologic and Phytochemical Studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* 24, 41–91.
- Brook, M.A., Chan, T.H., 1983. A Simple Procedure for the Esterification of Carboxylic Acids. *Synthesis (Stuttg.)* 201–203.
- Bruckner, R., 2001. *Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms*. Academic Press, San Diego, CA.
- Burow, M., Wittstock, U., Gershenzon, J., 2008. Sulfur-Containing Secondary Metabolites and their Role in Plant Defense, in: Hell, R., Dahl, C., Knaff, D., Leustek, T. (Eds.), *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Springer, pp. 201–222.

- Buske, A., Schmidt, J., Porzel, A., Adam, G., 1997. Benzopyranones and Ferulic Acid Derivatives from *Antidesma membranaceum*. *Phytochemistry* 46, 1385–1388.
- Carter, G.T., 2011. Natural Products and Pharma 2011: Strategic Changes Spur New Opportunities. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1783–1789.
- Cerella, C., Kelkel, M., Viry, E., Dicato, M., Jacob, C., Diederich, M., 2011. Naturally Occurring Organic Sulfur Compounds : an Example of a Multitasking Class of Phytochemicals in Anti-Cancer Research, in: Rasooli, I. (Ed.), *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health*. InTech.
- Cha, J.S., Kim, J.E., Lee, K.W., 1987. Facile Reduction of Saturated and Unsaturated Carboxylic Acids and their Salts to Aldehydes by Thexylbromoborane-Dimethyl Sulfide. *J. Org. Chem.* 52, 5030–5032.
- Cha, J.S., Kim, J.E., Oh, S.Y., Lee, J.C., Lee, K.W., 1987. Direct Conversion of Saturated and Unsaturated Carboxylic Acids into Aldehydes by Thexylbromoborane-Dimethyl Sulfide. *Tetrahedron Lett.* 28, 2389–2392.
- Chin, Y.-W., Jones, W.P., Rachman, I., Riswan, S., Kardono, L.B.S., Chai, H.-B., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Swanson, S.M., Cassady, J.M., Kinghorn, A.D., 2006. Cytotoxic Lignans from the Stems of *Helicteres hirsuta* Collected in Indonesia. *Phyther. Res.* 20, 62–65.
- Choi, J.H., Yoon, Y.G., 1995. Facile Reduction of Carboxylic Acids to Aldehydes by Lithium Gallium Hydride.pdf. *Bull. Korean Chem. Soc.* 16, 469–470.
- Cordell, G.A., 1984. Studies in the Thymelaeaceae I. Nmr Spectral Assignments of Daphnoretin. *J. Nat. Prod.* 47, 84–88.
- Core, E.L., 1967. Ethnobotany of the Southern Appalachian Aborigines. *Econ. Bot.* 21, 198–214.
- Cubbage, J.W., Guo, Y., Mcculla, R.D., Jenks, W.S., 2001a. Thermolysis of Alkyl Sulfoxides and Dreivatives: Comparison of Experiment and Theory. *J. Org. Chem.* 66, 8722–8736.
- Cubbage, J.W., Guo, Y., Mcculla, R.D., Jenks, W.S., 2001b. Thermolysis of Alkyl Sulfoxides and Dreivatives: Comparison of Experiment and Theory - Supporting Information. *J. Org. Chem.* 66, S4–S5.
- Cuenca, M.D.R., Catalan, C.A.N., Díaz, J.G., Herz, W., 1991. Monoterpenes and Lignans from *Mikania saltensis*. *J. Nat. Prod.* 54, 1162–1164.
- Da Costa, J.C.S., Pais, K.C., 2006. Simple Reduction of Ethyl, Isopropyl and Benzyl Aromatic Esters to Alcohols using Sodium Borohydride-Methanol System. *Arkivoc i*, 128–133.

- Darwish, F.M.M., Reinecke, M.G., 2003. Ecdysteroids and Other Constituents from *Sida spinosa* L. *Phytochem.* 62, 1179–1184.
- Davis, L.D., 2009. *Ornamental Shrubs for Garden, Lawns, and Park Planting*. Applewood Books, Bedford (MA).
- Drabowicz, J., Bujnicki, B., Mikolajczyk, M., 2003. An Efficient Procedure for the Synthesis of 18O-Labelled Methanesulfinyl Chloride. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 46, 1001–1005.
- Du Mont de Courset, G.L.M., 1811. *Le botaniste cultivateur*, 2e ed. Deterville & Goujon, Paris.
- Duhamel du Monceau, H.L., 1755. *Traité des arbres et arbustes qui se cultivent en France en pleine terre*. H. L. Guerin & L. F. Delatour, Paris.
- Erichsen-Brown, C., 1979. *Medicinal and Other Uses of North American Plants - A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes*. Dover Publications, Inc., New York.
- Ertl, P., Rohde, B., Slezer, P., 2000. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment Based Contributions and its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* 43, 3714–3717.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The Value of Plants used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Heal. Perspect.* 109, 69–75.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., 2001. The Chemical Diversity and Distribution of Glucosinolates and Isothiocyanates among Plants. *Phytochemistry* 56, 5–51.
- Floden, A.J., Mayfield, M.H., Ferguson, C.J., 2009. A New Narrowly Endemic Species of *Dirca* (Thymelaeaceae) from Kansas and Arkansas, with a Phylogenetic Overview and Taxonomic Synopsis of the Genus. *J. Bot. Res. Inst. Texas* 3, 485–499.
- Franke, K., Porzel, A., Schmidt, J., 2002. Flavone-Coumarin Hybrids from *Gnidia socotrana*. *Phytochemistry* 61, 873–878.
- Fridén-Saxin, M., Pemberton, N., da Silva Andersson, K., Dyrager, C., Friberg, A., Grøtli, M., Luthman, K., 2009. Synthesis of 2-Alkyl-Substituted Chromone Derivatives Using Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* 74, 2755–2759.
- Gagnon, R., Bouchard, S., Tremblay, E., 1985. Structure d'âge d'une formation d'érables à sucre, Réserve écologique de Couchepaganiche, Méthabetchouan, Lac Saint-Jean, Québec. *Ann. ACFAS* 53, 324.
- Gleason, H.A., Cronquist, A., 1993. *Manual of vascular plants of Northeastern United States and Adjacent Canada*, 2nd ed. The New York Botanical Garden, Bronx (NY).

- Golchoubian, H., Hosseinpoor, F., 2007. Effective Oxidation of Sulfides to Sulfoxides with Hydrogen Peroxide under Transition-Metal-Free Conditions. *Molecules* 12, 304–311.
- Gray, A., Fernald, M.L., 1970. *Gray's Manual of Botany*. American Book, New York.
- Harborne, J.B., 1975. Biosynthesis of Phenolic Compounds Derived from Shikimate, in: *Biosynthesis*. Royal Society of Chemistry, pp. 89–112.
- Harrison, G.C., Diehl, H., 1943. β -Ethoxyethyl Bromide. *Org. Synth.* 23, 32.
- Hartwell, J.L., 1982. *Plants Used Against Cancer: a Survey*. Quarterman Publications, Lawrence.
- Harvey, A.L., 2008. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* 13, 894–901.
- Hatch, R.P., Shringarpure, J., Weinreb, S.M., 1978. Studies on Total Synthesis of the Olivomycins. *J. Org. Chem.* 43, 4172–4177.
- Hay, M.P., Hicks, K.O., Pchalek, K., Lee, H.H., Blaser, A., Pruijn, F.B., Anderson, R.F., Shinde, S.S., Wilson, W.R., Denny, W.A., 2008. Tricyclic [1,2,4]Triazine 1,4-Dioxides as Hypoxia Selective Cytotoxins. *J. Med. Chem.* 51, 6853–6865.
- He, W., Cik, M., Appendino, G., van Puyvelde, L., Leysen, J.E., de Kimpe, N., 2002. Daphnane-Type Diterpene Orthoesters and their Biological Activities. *Mini Rev. Med. Chem.* 2, 185–200.
- Hecker, E., 1977. New Toxic, Irritant and Cocarcinogenic Diterpene Esters from Euphorbiaceae and from Thymelaeaceae. *Pure Appl. Chem.* 49, 1423–1431.
- Helguera, A.M., Pérez-Garrido, A., Gaspar, A., Reis, J., Cagide, F., Vina, D., Cordeiro, M.N.D.S., Borges, F., 2013. Combining QSAR Classification Models for Predictive Modeling of Human Monoamine Oxidase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 59, 75–90.
- Herrick, J.W., Snow, D.R., 1995. *Iroquois Medical Botany, The Iroquois and Their Neighbors*. Syracuse University Press.
- Hojo, M., Masuda, R., 1976. A New Convenient Method of Dethioacetalization. *Synthesis (Stuttg)*. 678–680.
- Hu, X.-J., Jin, H.-Z., Zhang, W.-D., Zhang, W., Yan, S.-K., Liu, R.-H., Shen, Y.-H., Xu, W.-Z., 2009. Two New Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*. *Nat. Prod. Res.* 23, 1259–1264.
- Hunt, I., 2006. Reaction of Alcohols with other Halogenating Agents [WWW Document]. *Org. Chem. On-Line Learn. Cent. - Univ. Calgary*. URL <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch04/ch4-6.html> (accessed 3.18.14).

- Hussain, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Krohn, K., 2012. The Chemistry and Biology of Bicoumarins. *Tetrahedron* 68, 2553–2578.
- lang, Z.-H.J., Anaka, T.T., Akamoto, T.S., Ouno, I.K., Uan, J.-A.D., 2002. Biflavanones , Diterpenes , and Coumarins from the Roots of *Stellera chamaejasme* L . 50, 137–139.
- Inoshiri, S., Sasaki, M., Hirai, Y., Kohda, H., Otsuka, H., Yamasaki, K., 1986. Inhibition of Mast Cell Histamine Release by 2,6-Dimethoxy-p-Benzoquinone Isolated from *Berchemia racemosa*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 34, 1333–1336.
- Itoh, T., Tsukane, M., Koike, M., Nakamura, C., Ohguchi, K., Ito, M., Akao, Y., Koshimizu, S., Nozawa, Y., Wakimoto, T., Nukaya, H., Suwa, Y., 2010. Inhibitory Effects of Whisky Congeners on IgE-Mediated Degranulation in Rat Basophilic Leukemia RBL-2H3 Cells and Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7149–7157.
- Jo, G., Hyun, J., Hwang, D., Lee, Y.H., Koh, D., Lim, Y., 2011. Complete NMR Data of Methoxylated cis- and trans-Stilbenes as well as 1,2-Diphenylethanes. *Magn. Reson. Chem.* 49, 374–377.
- Kanehisa Laboratories, 2012. Glucosinolate Biosynthesis [WWW Document]. *Kyoto Encycl. Genes Genomes*. URL http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00966 (accessed 1.22.13).
- Kanehisa Laboratories, 2013. Flavonoid Biosynthesis [WWW Document]. *Kyoto Encycl. Genes Genomes*. URL http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00941&show_description=show (accessed 1.23.13).
- Kikkawa, S., Nomura, M., Shimizu, M., 1980. The Dehydrochlorination of Gem-Dichloroalkane and the Formation of Dienes from the Reactions of Butenes and Cyclohexene with Chlorine through Molten Salt. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 53, 2586–2591.
- Klimko, V.T., Protopopova, T. V., Skoldinov, A.P., 1964. Functional Derivatives of Malonaldehyde and their Reactions. XIII. Some Transformations of β -Alkoxyacroleins. A new Synthesis of β -Chloroacroleins. *Zhurnal Obs. Khimii* 34, 109–114.
- Koizumi, H., Yokoshima, S., Fukuyama, T., 2010. Total Synthesis of (-)-Morphine. *Org. Lett.* 5, 2192–2198.
- Kokubo, T., Taniguchi, Y., Kanayama, M., Shimura, M., Konishi, Y., Kawagishi, H., Yamamoto, M., Shindo, K., Yoshida, A., 2011. Extract of the Mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii* Induces a Series of Anti-Oxidative and Phase II Detoxifying enzymes through Activation of the Transcription Factor Nrf2. *Food Chem.* 129, 92–99.
- Koval', I. V., 2007. Reactions of Thiols. *Russ. J. Org. Chem.* 43, 319–346.

- Lampe, K.F., Fagerström, R., 1968. *Plant Toxicity and Dermatitis: a Manual for Physicians*. Williams & Wilkins, Baltimore (MD).
- Lee, D.-H., Taher, A., Hossain, S., Jin, M.-J., 2011. An Efficient and General Method for the Heck and Buchwald-Hartwig Coupling Reactions of Aryl Chlorides. *Org. Lett.* 13, 5540–5543.
- Levas, M., Levas, É., 1960. Synthèse des chloro-2-chromones, nouvelles voie d'accès aux hydroxy-4 coumarines. *Compt. Rend.* 250, 2819–2821.
- Li, S.-S., Gao, Z., Feng, X., Hecht, S.M., 2004. Biscoumarin Derivatives from *Edgeworthia gardneri* that Inhibit the Lyase Activity of DNA Polymerase Beta. *J. Nat. Prod.* 67, 1608–1610.
- Li, X.-B., Liu, J.-T., 2007. Reaction of Alkanesulfinyl Chloride with Grignard Reagents: a Convenient Synthesis of Alkyl Sulfoxides. *Chinese J. Chem.* 25, 1309–1311.
- Li, Y.-Z., Tong, A.-P., Huang, J., 2012. Two New Norlignans and a New Lignanamide from *Peperomia tetraphylla*. *Chem. Biodivers.* 9, 769–776.
- Liao, S.-G., Chen, H.-D., Yue, J.-M., 2009. Plant orthoesters. *Chem. Rev.* 109, 1092–1140.
- Lin, R.-W., Tsai, I.-L., Duh, C.-Y., Lee, K.-H., Chen, I.-S., 2004. New Lignans and Cytotoxic Constituents from *Wikstroemia lanceolata*. *Planta Med.* 70, 234–238.
- Marie-Victorin, 2002. *Flore laurentienne*, 3e ed. Gaëtan Morin éditeur, Montréal.
- Maryanoff, B.E., Reitz, A.B., 1989. The Wittig Olefination Reaction and Modifications Involving Phosphoryl-Stabilized Carbanions. *Stereochemistry, Mechanism, and Selected Synthetic Aspects*. *Chem. Rev.* 863–927.
- McCune, L.M., Johns, T., 2007. Antioxidant Activity Relates to Plant Part, Life Form and Growing Condition in some Diabetes Remedies. *J. Ethnopharmacol.* 112, 461–469.
- McOmie, J.F.W., Watts, M.L., West, D.E., 1968. Demethylation of Aryl Methyl Ethers by Boron Tribromide. *Tetrahedron* 24, 2289–2292.
- Menchikov, L.G., Vorogushin, A. V., Korneva, O.S., Nefedov, O.M., 1995. An Effective Method for Alcohol Preparation by Hydrolysis of Organohalides in the Presence of Copper and its Salts in Aqueous DMSO. *Mendeleev Commun.* 5, 223–224.
- Mo, F., Trzepakowski, L.J., Dong, G., 2012. Synthesis of Ortho-Acylphenols through the Palladium-Catalyzed Ketone-Directed Hydroxylation of Arenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51, 13075–9.
- Moerman, D.E., 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press, Inc., Portland (OR).

- Molinspiration, n.d. Interactive PSA Calculator [WWW Document]. URL <http://www.molinspiration.com/services/psa.html> (accessed 6.17.14).
- Monks, T.J., Butterworth, M., Lau, S.S., 2010. The Fate of Benzene-Oxide. *Chem. Biol. Interact.* 184, 201–206.
- Nesom, G.L., Mayfield, M.H., 1995. A New Species of *Dirca* (Thymelaeaceae) from the Sierra of Northeastern Mexico. *Sida* 16, 459–467.
- Obaseki, A.O., Porter, W.R., Trager, W.F., 1982. 4-Hydroxycoumarin/2-Hydroxychromone Tautomerism: Infrared Spectra of 2-13c and 3-D Labeled 4-Hydroxycoumarin and its Anion. *J. Heterocyc. Chem.* 19, 385–390.
- Olah, G., Prakash, G., Arvanaghi, M., 1984. *Synthetic Methods and Reactions; part 109. Improved Preparation of Aldehydes and Ketones from N,N-Dimethylamides and Grignard Reagents. Synthesis (Stuttg).* 228–230.
- Oyama, K., Yoshida, K., Kondo, T., 2011. Recent Progress in the Synthesis of Flavonoids: From Monomers to Supra-Complex Molecules. *Curr. Org. Chem.* 15, 2567–2607.
- Palik, B., Kastendick, D., 2009. Woody Plant Regeneration after Blowdown, Salvage Logging, and Prescribed Fire in a Northern Minnesota Forest. *For. Ecol. Manage.* 258, 1323–1330.
- Park, Y., Moon, B., Yang, H., Lee, Y., Lee, E., Lim, Y., 2007. Complete Assignments of NMR Data of 13 Hydroxymethoxyflavones. *Magn. Reson. Chem.* 45, 1072–1075.
- Peterson, B.J., Graves, W.R., 2011. Reproductive Ecology of *Dirca palustris* L. (Thymelaeaceae). *Castanea* 76, 237–244.
- Pierson, J.-T., Dumètre, A., Hutter, S., Delmas, F., Laget, M., Finet, J.-P., Azas, N., Combes, S., 2010. Synthesis and Antiprotozoal Activity of 4-Arylcoumarins. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 864–9.
- Rago, R., Mitchen, J., Wilding, G., 1990. DNA Fluorometric Assay in 96-Well Tissue Culture Plates using Hoechst 33258 after Cell Lysis by Freezing in Distilled Water. *Anal. Biochem.* 191, 31–34.
- Rajanna, K.C., Reddy, N.M., Reddy, M.R., Saiprakash, P.K., 2007. Micellar Mediated Halodecarboxylation of α,β -Unsaturated Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acids—A Novel Green Hunsdiecker–Borodin Reaction. *J. Dispers. Sci. Technol.* 28, 613–616.
- Ramiandrasoa, P., Bréhon, B., Thivet, A., Alami, M., Cahiez, G., 1997. An Efficient Synthesis of Stereodefined Enynes and Dienes via Pd-Catalyzed Reaction of Chloroenynes and Chlorodienes with Grignard Reagents. *Tetrahedron Lett.* 38, 2447–2450.

- Ramsewak, R.S., Nair, M.G., DeWitt, D.L., Mattson, W.G., Zasada, J., 1999. Phenolic Glycosides from *Dirca palustris*. *J. Nat. Prod.* 62, 1558–1561.
- Ramsewak, R.S., Nair, M.G., Murugesan, S., Mattson, W.J., Zasada, J., 2001. Insecticidal Fatty Acids and Triglycerides from *Dirca palustris*. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 5852–5856.
- Remington, J.P., Woods, H.C., 1918. *The Dispensary of the United States of America*, 20th ed. Lippincott.
- Scannell, J.W., Blanckley, A., Boldon, H., Warrington, B., 2012. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 191–200.
- Schuster, M., Blechert, S., 1997. Olefin Metathesis in Organic Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 36, 2036–2056.
- Shi, C., Xu, M.-J., Bayer, M., Deng, Z.-W., Kubbutat, M.H.G., Wätjen, W., Waejen, W., Proksch, P., Lin, W.-H., 2010. Phenolic Compounds and their Anti-Oxidative Properties and Protein Kinase Inhibition from the Chinese Mangrove Plant *Laguncularia racemosa*. *Phytochemistry* 71, 435–442.
- Shirini, F., Zolfigol, M.A., 2001. Efficient Oxidation of Sulfides to Sulfoxides and of Thiols to Disulfides with Aqueous HIO₃. *Russ. J. Org. Chem.* 37, 1–2.
- Snelders, D.J.M., Dyson, P.J., 2011. Efficient Synthesis of β -Chlorovinylketones from Acetylene in Chloroaluminate Ionic Liquids. *Org. Lett.* 13, 4048–4051.
- Sosnovskikh, V., Usachev, B., 2000. 2-Polyfluoroalkylchromones. 5. Nitration and Chlorination of 2-Trifluoromethylchromones. *Russ. Chem. Bull.* 49, 2074–2076.
- Southern, J.M., O’Neil, I.A., Kearns, P., 2008. A Concise Synthesis of Highly Functionalised 4-Thiosugar Derivatives. *Synlett* 2158–2160.
- Stack, D.P., Coates, R.M., 1984. Preparation of β -Haloacryloyl Chlorides. *Synthesis (Stuttg.)* 434–436.
- Su, J., Wu, Z.J., Liu, R.H., Shen, Y.H., Zhang, C., Li, H.L., Zhang, W., Zhang, W.D., 2007. A New Coumarin Glycoside from *Daphne giraldii*. *Chinese Chem. Lett.* 18, 835–836.
- Suh, N., Luyengi, L., Fong, H.H., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., 1995. Discovery of Natural Product Chemopreventive Agents Utilizing HL-60 Cell Differentiation as a Model. *Anticancer Res.* 15, 233–239.
- Sulko, J., 2000. Methylation of 4-Hydroxycoumarin with Diazomethane. *Acta Pol. Pharm.* 57, 79–80.

- The Plant List, 2010. Thymelaeaceae [WWW Document]. URL <http://www.theplantlist.org/browse/A/Thymelaeaceae/> (accessed 6.20.12).
- Tremblay, N.O., Larocque, G.R., 2001. Seasonal Dynamics of Understory Vegetation in Four Eastern Canadian Forest Types. *Int. J. Plant Sci.* 162, 271–286.
- Trofimov, B.A., Oparina, L.A., Gusarova, N.K., Belogorlova, N.A., Chernysheva, N.A., Ivanova, N.I., Parshina, L.N., Henkelmann, J., 2004. An Expedient Synthesis of Methyl Vinyl Sulfide from Dimethyl Disulfide and Acetylene. *J. Sulfur Chem.* 25, 395–399.
- Tsuchihashi, G., Ogura, K., 1971. The α -Chlorination of Sulfoxides with N-Chlorosuccinimide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 44, 1726.
- United States Department of Agriculture, 2014. *Dirca occidentalis* A. Gray - Western Leatherwood [WWW Document]. Nat. Resour. Conserv. Serv. - Plants. URL <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=DIOC3> (accessed 1.15.14).
- United States Department of Agriculture, 2012. *Dirca palustris* L. - Eastern Leatherwood [WWW Document]. Nat. Resour. Conserv. Serv. - Plants. URL <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=dipa9> (accessed 6.26.12).
- Van der Bank, M., Fay, M.F., Chase, M.W., 2002. Molecular Phylogenetics of Thymelaeaceae with Particular Reference to African and Australian Genera. *Taxon* 51, 329–339.
- Velvadapu, V., Paul, T., Wagh, B., Glassford, I., DeBrosse, C., Andrade, R.B., 2011. Total Synthesis of (-)-4,8,10-Tridesmethyl Telithromycin. *J. Org. Chem.* 76, 7516–7527.
- Villeneuve, G.B., Chan, T.H., 1997. A Rapid, Mild and Acid-Free Procedure for the Preparation of Acyl Chlorides including Formyl Chloride. *Tetrahedron Lett.* 38, 6489–6492.
- Volkov, A.N., Volkova, K.A., Levanova, E.P., Nikolskaya, A.N., Babalov, G.K., Kudirov, G., Stepanova, V.N., 1981. Method of Preparing 1-Alkylthio-1-Buten-3-yns. SU806679.
- Vollhardt, K., Schore, N., 2009. *Traité de chimie organique*, 5e ed. Éditions De Boeck Université, Bruxelles, Belgique.
- Wang, H.-B., Liu, L.-P., Wang, X.-Y., 2013. ¹³C-NMR Data of Daphnane Diterpenoids. *Magn. Reson. Chem.* 51, 580–592.
- Wang, L.Q., Zhao, Y.X., Zhou, L., Zhou, J., 2009. Lignans from *Gnetum montanum* Markgr. f. *megalocarpua*. *Chem. Nat. Compd.* 45, 424–426.
- Webster, A.D., 2004. *Hardy Ornamental Flowering Trees And Shrubs*, 2nd ed. Hicks, Wilkinson & Sears, London.

- Williams, C., 2004. Mating System and Pollination Biology of the Spring Flowering Shrub, *Dirca palustris*. *Plant Species Biol.* 19, 101–106.
- Wuts, P.G.M., Greene, T.W., 2007. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Xiao, Y., Xu, Y., Cheon, H.-S., Chae, J., 2013. Copper(II)-Catalyzed Hydroxylation of Aryl Halides using Glycolic Acid as a Ligand. *J. Org. Chem.* 78, 5804–5809.
- Youn, J.-H., Herrmann, R., 1986. A Simple and Efficient Preparation of Sulfinyl Chlorides from Disulfides and Sulfonyl Chloride. *Tetrahedron Lett.* 27, 1493–1494.
- Zahir, A., Jossang, A., Bodo, B., Provost, J., Cosson, J.P., Sévenet, T., 1996. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 701–703.
- Zhang, Y., 1991. Synthesis of Methyl Vinyl Sulfoxide. *Youji Huaxue* 11, 515–516.

ANNEXE I

VOIE BIOSYNTHÉTIQUE HYPOTHÉTIQUE DES DIRCHROMONES

Les voies de biosynthèse des dirchromones identifiées dans ce projet sont, à notre connaissance, inconnues. Les réflexions à ce sujet permettent néanmoins d'écarter certaines hypothèses de travail. Ce faisant, il était possible d'avancer que les dirchromones avaient une origine métabolique différente de celle d'autres produits naturels courants (voir chapitre III).

La première hypothèse de travail a été de partir du métabolisme potentiel de la chromone. Deux avenues sont possibles : A) la synthèse de la chromone à partir des polyacétates ou B) le catabolisme d'un flavonoïde en chromone (Harborne, 1975) (Figure 63).

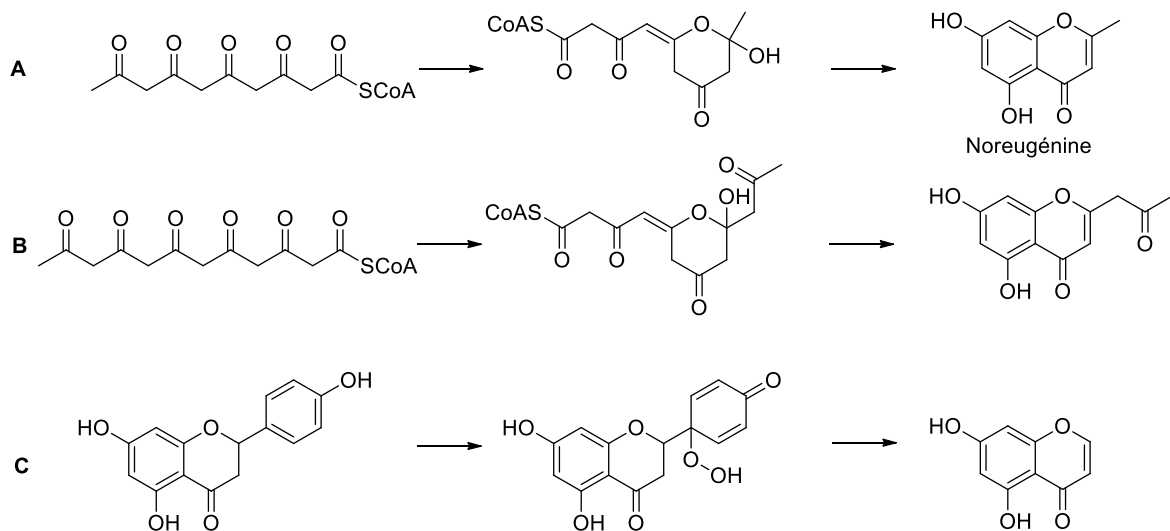


Figure 63. Biosynthèses des chromones par anabolisme (polyacétates, A et B) ou catabolisme (à partir des flavonoïdes, C).

La voie des polyacétates produit des chromones 2-alkylées. Le groupement méthyle semble être le plus commun en nature, comme pour la noreugénine. Des chaînes plus longues sont envisageables (Buske et al., 1997), mais elles seront toujours terminées par un méthyle et compteront un nombre impair de carbones. Cette voie n'est donc pas applicable pour les dirchromones, à moins d'envisager des mécanismes exotiques.

Pour sa part, le catabolisme d'un flavonoïde ne laisse pas de chaîne latérale sur le cycle B. La position 2 n'est pas fonctionnalisée. Ainsi, le greffage d'une chaîne est encore là difficile à envisager, sauf en perdant l'insaturation. En outre, les étapes issues de la voie des polyacétates produisent une substitution 5,7. Celle-ci n'a pas été retrouvée chez les dirchromones, qui présentent plutôt des substitutions incompatibles avec cette biosynthèse. Les voies métaboliques « classiques » des chromones ont donc été écartées.

Le problème a ensuite été examiné en prenant comme point de départ la présence de soufre. Les glucosinolates et les produits de dégradation de l'alliine sont les produits soufrés les plus communs chez les plantes (Ariga and Seki, 2006; Burow et al., 2008; Cerella et al., 2011; Fahey et al., 2001). Ces deux classes trouvent leur origine chez les acides aminés : la méthionine pour les isothiocyanates (Kanehisa Laboratories, 2012) et la cystéine pour l'alliine (Cerella et al., 2011). Ces deux acides aminés ont donc été envisagés comme produits de départ d'une biosynthèse.

La voie envisagée à partir de la méthionine combine le métabolisme des glucosinolates (Kanehisa Laboratories, 2012) et la voie des polyacétates (Figure 64). Une aminotransférase (BCAT4) remplace l'amine par une cétone. Ce point d'ancrage sert ensuite à l'élongation de la chaîne par la méthylthioalkylmalate synthase (MAM1), de manière analogue à la voie des polyacétates. Par hypothèse, une décarboxylation sélective retire le groupement carboxyle issu de l'acide aminé original. Dès lors, la chaîne peut être allongée par la voie habituelle des polyacétates. Une cyclisation suivie d'une condensation permet finalement d'obtenir un squelette chromanone muni d'un sulfide oxydable en sulfoxide. Toutefois, il manque ici les deux insaturations communes à toutes les dirchromones, sans qu'il ne subsiste de fonction susceptible

de les générer. Si on y ajoute la substitution 5,7 qui entre une fois de plus en contradiction avec les molécules isolées, cette voie ne semble pas réaliste.

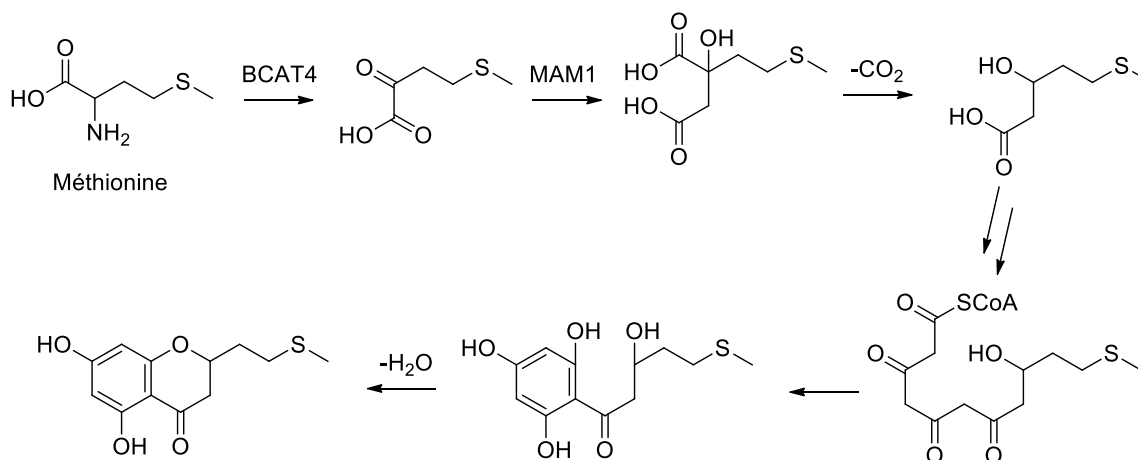


Figure 64. Biosynthèse exploratoire d'une dirchromone à partir de la méthionine.

La cystéine est un meilleur substrat initial (Figure 65). La chaîne à nombre impair de carbones ne requiert pas de décarboxylation. L'élongation par la voie des polyacétates peut donc procéder dès le retrait de l'amine. L'aromatization et deux condensations permettent ensuite d'obtenir une chromanone possédant une chaîne cette fois insaturée en position 2. L'insaturation manquante pourrait être obtenue par la flavone synthase (FNSI), qui joue le même rôle pour convertir les flavanones en flavones (Kanehisa Laboratories, 2013), ou une enzyme similaire. La méthylation du thiol et l'oxydation du sulfide an sulfoxide pourraient se produire à tout moment dans cette chaîne de réactions. La structure générée par cette voie de biosynthèse est celle qui se rapproche le plus des dirchromones. Toutefois, la substitution du cycle aromatique pose encore problème.

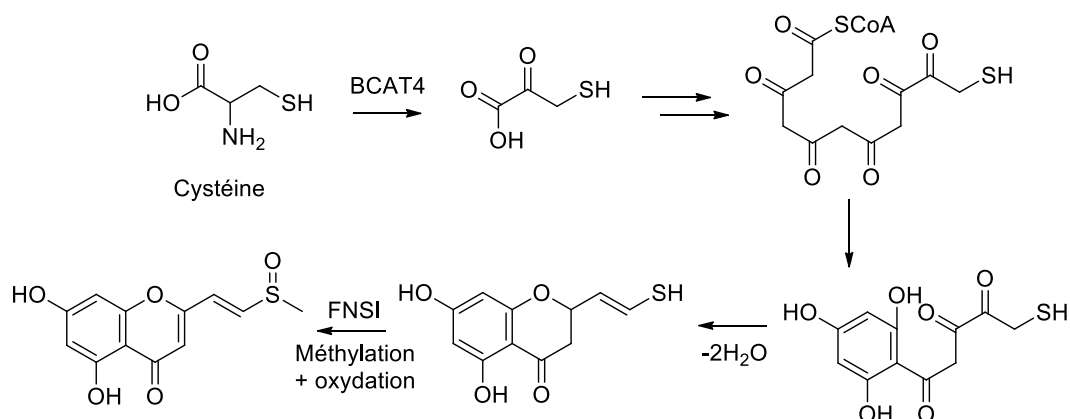


Figure 65. Biosynthèse exploratoire d'une dirchromone à partir de la cystéine.

Aucune des voies envisagées ne permet donc d'obtenir la substitution observée des dirchromones. Trois autres observations viennent davantage nuancer le portrait.

D'abord, la présence de 6,7-diméthoxyflavone peut indiquer l'existence d'une enzyme inconnue donnant accès à une substitution exotique des flavones et chromones à partir de composés plus classiques. C'est à tout le moins une hypothèse valable pour la 6,7-diméthoxydirchromone.

Par ailleurs, la 2-hydroxyéthylchromone brouille les cartes biosynthétiques. Elle pourrait être issue du catabolisme des dirchromones, ou encore faire partie des précurseurs. Il manque trop de chaînons pour pouvoir émettre d'hypothèses concluantes à son sujet.

Enfin, la dircoxépine semble métaboliquement liée aux dirchromones. La tautomérisation entre oxépine et oxyde de benzène pourrait très bien expliquer la substitution observée pour les dirchromones (Figure 66). Ces dernières seraient issues de la réduction ou de l'hydrolyse de l'époxyde, favorable puisqu'elle génère un cycle aromatique. Dans ce cas, il faut envisager une voie métabolique permettant d'obtenir les oxépines. Les cytochromes P450, entre autres, sont

capables d'oxyder le benzène en oxyde de benzène (et donc en oxépine) (Monks et al., 2010). La dirchromone deviendrait ainsi un précurseur biosynthétique potentiel de toute la famille. Cependant, cela n'indique pas davantage quelle serait l'origine de ce composé parent.

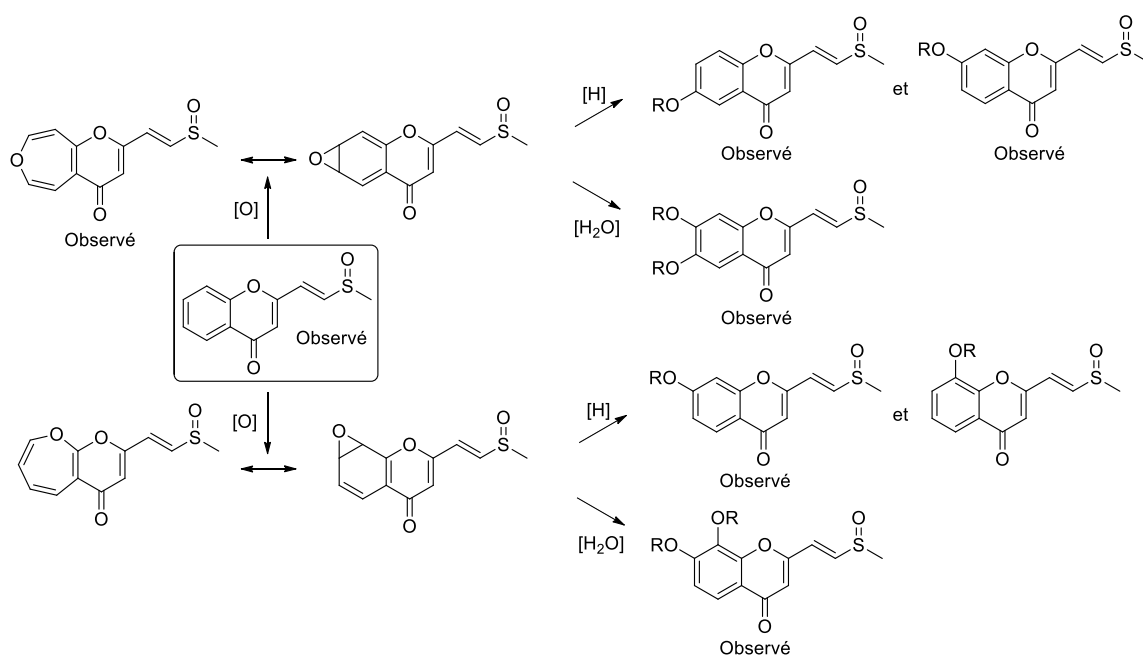


Figure 66. Lien métabolique possible entre les dircoxépines et les dirchromones.

En conclusion, d'autres travaux seraient nécessaires pour préciser la biosynthèse potentielle des dirchromones. Cela dit, il est possible d'avancer que cette dernière fait appel à au moins un mécanisme la distinguant des schémas métaboliques classiques.

ANNEXE II

LE BOIS DE PLOMB : UNE NOTE ÉTYMOLOGIQUE

Gracieusement préparé par

Xavier St-Gelais

Étudiant au Baccalauréat en linguistique et langue française, UQAC

Les noms vernaculaires des plantes nous en apprennent souvent beaucoup sur leurs propriétés : bien avant l'avènement de la taxonomie moderne, nos ancêtres se fiaient sur leurs connaissances du monde pour nommer les éléments de leur réalité physique. Le lien entre le nom et l'espèce est parfois clair : on voit bien pourquoi les boutons d'or ont été baptisés de la sorte. Il est cependant des cas où le lien entre l'utilité ou l'aspect d'une plante et son nom n'est pas évident, et c'est le cas du bois de plomb, appellation populaire de *Dirca palustris*. Il n'y a pas de consensus sur la signification et sur l'origine de ce nom. Cette brève note étymologique vise à offrir un portrait plausible de l'implantation de cette expression dans le lexique des Canadiens français.

Les hypothèses avancées jusqu'ici sont nombreuses. Une recherche dans plusieurs manuels de botanique canadienne des derniers siècles m'a permis de constater l'existence d'une réelle confusion quant aux origines du nom : personne ne semble s'entendre. Certains auteurs proposent même deux hypothèses plutôt qu'une. La liste suivante fait état des différentes théories (présentées en ordre chronologique) et les regroupe en catégories (H1, H2, H3, H4, H5, H6).

LA GALISSONNIÈRE, CA. 1725 (CITÉ DANS MUMA, 2014) (H1)

Le marquis de la Galissonnière aurait écrit dans une note qu'on appelait le *Dirca* « **pelon** » (l'impératif de la première personne du pluriel du verbe *peler*) **à cause de la facilité avec laquelle on pouvait en enlever l'écorce.**

GAULTIER, 1749.A (H2)

« Bois de plomb, **ainsi nommé par dérision, parce qu'il est extraordinairement léger.** »

GAULTIER, 1749.B (H3)

« B. Timalea est appelé **Pelon**, parce qu'il se pèle, en quelque Province de France on nomme l'osier Pelon pour la meme raison. »

CUVIER ET AL., 1817.A..... (H4)

« BOIS DE CUIR (*Bot.*), *Dirca palustris* [...] Quelques auteurs l'ont nommé bois de plomb; **on pourroit présumer que c'est par méprise, et qu'en traduisant son nom anglois *leather-wood*, on aura confondu *leather* avec *leader*, qui signifie plomb.** »

CUVIER ET AL., 1817.B..... (H3)

« Mais il paroît que cette dénomination étoit ancienne chez nos Canadiens, et qu'elle venoit de ce que, **dans plusieurs provinces de l'intérieur de la France, on nomme l'osier plomb : on l'a donnée à cet arbuste, qui, dans le nouveau monde, remplaçoit avantageusement les espèces de saules.** (A. P.) »

BIGELOW, 1818..... (H5)

« It is remarkable for the flexibility of its wood and toughness of its bark, which are so great that it cannot be broken without great difficulty. The Aborigines employed it for their cordage, and from its great tenacity the name of *Leather wood* has been applied to it in most parts of the United States. **The Canadian French called it *Bois de Plomb* or *Leaden wood* from its flexibility.** »

BRUNET, 1818..... (H1)

« *Vulgo.* Bois de **pelon.** [...] **Son nom vulgaire français vient de ce que son écorce s'enlève facilement.** »

MARIE-VICTORIN, 1937.A..... (H6)

« On a suggéré comme origine de cette appellation l'emploi dans nos campagnes du verbe «déplomber» pour signifier «purger énergiquement». **On sait que l'absorption du plomb ou de ses composés provoque des troubles connus sous le nom de coliques saturnines (ou coliques de plomb) caractérisées par une constipation opiniâtre. Si «déplomber» signifie purger, on comprend dès lors facilement que le *Dirca*, purgatif énergique, ait pu recevoir du vulgaire le nom de Bois de plomb.** »

MARIE-VICTORIN, 1937.B..... (H4)

« BIGELOW (1818) dit que les Canadiens français l'ont [*le Dirca palustris*] ainsi appelé [bois de plomb] à cause de sa grande souplesse. Il y a une autre explication à laquelle on ne paraît pas avoir pensé et qui pourrait avoir sa valeur. **N'y a-t-il pas un rapport entre Bois de plomb et «*Leather-wood*», nom qu'on lui donne aux États-Unis? «*Leather-wood*» prononcé rapidement devient vite «*Lead-wood*»; de là à traduire il n'y a qu'un pas.** »

AVIS ET AL., 1967..... (H1)

« *Leatherwood*, *Moosewood*, Bois de **pelon** (*Cdn French* "bald wood"). A deciduous shrub. [...] The whole plant is remarkably pliable, and **the bark so strong and flexible as to be frequently used for ligatures**, and for straps to carry burdens; **it is**

easily stripped off the plant its whole length when required for use; whence probably the name Bois de pelon, usually pronounced *Bois de plumb*. »

En résumé, on peut classer les hypothèses sous 6 étiquettes :

H1. *Bois de plomb* est une réinterprétation du mot *pelon*, une sorte de déverbal du verbe *peler*, en référence à la facilité avec laquelle on peut enlever l'écorce du *Dirca*.

H2. *Bois de plomb* est un nom qui tourne en dérision la légèreté de l'écorce de l'arbuste en la comparant à la lourdeur du métal.

H3. Hypothèse proche de **H1**, avec cela de différent que le nom aurait émergé après une comparaison avec l'osier, appelé *plomb* en France septentrionale.

H4. *Bois de plomb* est une traduction issue d'une confusion du nom anglais de la plante, *leatherwood*, qui, prononcé rapidement, peut être entendu *leaden-wood*.

H5. *Bois de plomb* fait référence à la flexibilité de l'écorce du *Dirca* en la comparant à la malléabilité du métal.

H6. *Plomb* est une référence à *déplomber*, terme utilisé pour signifier « purger » : or, le *Dirca* est un puissant purgatif.

De toutes ces hypothèses, c'est la troisième, H3, qui me semble être la plus plausible. Plusieurs éléments trouvés dans des documents historiques tendent à corroborer cette théorie, alors que d'autres contribuent à infirmer les autres. Dans les prochaines pages, j'examinerai les faits de manière à faire ressortir la vraisemblance et l'invraisemblance des affirmations recensées plus haut.

La première étape pour comprendre la signification de l'expression *bois de plomb*, c'est de voir dans quel contexte historique elle est apparue. C'est dans un manuscrit de Louis Nicolas paru vers la fin du XVII^e siècle (Doyon, 2006), *l'Histoire naturelle ou la fidelle recherche de tout ce qu'il y a de rare dans les Indes Occidentales*, qu'on trouve la première mention écrite de ce nom

pour *Dirca palustris*. L'auteur était un prêtre jésuite venu en voyage en Nouvelle-France quelques décennies après la fondation de Québec (Gagnon, 2006).

De l'arbrisseau qu'on appelle du bois de plom. Cét par ce rare arbrisseau que ie veux finir de parler des arbrisseaux pour entretenir au plutot les curieux des raretés de nos grands arbres. Le bois de plom est si utiles aux habitans des vastes forets de l'Amerique qu'il leur sert non seulement pour bruler comme toutes les autres sortes de bois, mais ils en font même du fil le plus fort, et le plus fin du monde, dont ils font des filets de toutes façons, et de toutes grandeurs pour la chasse, et pour la pêche, ils en font des belles nattes, des cordes, des sacs, des branles, et mille autre chozes [...]. Les Ameriquains ne se servent point de quenouille pour filer elles retordent seulement leur chanvvre bien préparé sur leur cuisses après ces apés elles donnent la tainture qui leur plait a leur fil pour en faire des tours de tête, des ceintures, des coliers, et des cordages pour faire des maitres a des grands filets, iamais on na veu de bois plus propre a bastonner que le bois de plom [...].

L'aspect central de cette description est la souplesse de l'écorce du *Dirca*, qui semble être une plante extrêmement utilisée par les peuples autochtones. Par conséquent, elle a dû être parmi les premières à être remarquées par les Européens. C'est aussi ce qui se dégage de plusieurs des citations reproduites en page 2. Une lettre du Père Paul le Jeune, Jésuite ayant résidé à Québec aux débuts de la Nouvelle-France, qui figure dans les *Relations* des Jésuites de 1633, permet de le confirmer : « [...] les hommes font le corps de leurs canots, les femmes cousent l'écorce avec de l'osier, ou un petit bois semblable ». Il s'agit probablement d'une allusion au *Dirca* (l'allusion au fil laisse peu de doutes). Considérant cela, il est peu vraisemblable que Nicolas utilise *bois de plom* sous l'influence de l'anglais, langue avec laquelle, dans le contexte de son époque, il a probablement eu très peu de contacts. Il consigne à l'écrit une expression sans doute déjà bien implantée dans le lexique des colons (il précise d'ailleurs que son texte traite de « l'arbrisseau que l'on appelle bois de plom »). Ces éléments me semblent suffire à écarter l'hypothèse H4, qui postulait un emprunt déformé de l'anglais.

La lettre de Paul le Jeune est également intéressante en ce qu'elle fait une allusion spécifique à l'osier, plante qui est aussi mentionnée dans les explications étymologiques de

Gaultier (1749) et de Cuvis *et al.* (1817) pour H5. Il est manifeste que le *Dirca*, plante indigène d'Amérique du Nord, a dû, de par l'utilisation qu'en faisaient les autochtones, rappeler les espèces du genre *Salix* aux nouveaux arrivants.

Or, l'immense majorité des Français venus en Nouvelle-France avant 1700 étaient originaires du nord de l'Hexagone, en pays d'oïl (Morin, 2002; Martineau, 2005). L'osier y était une plante commune. On donnait d'ailleurs à cette plante des noms très semblables d'une région à l'autre, mais tous pouvant être ramenés à une forme <pelon>. Sous différentes graphies (*pelon, plon, plom, pion, piau, plomb, pegnon, etc.*), qui dépendent sans doute des compétences variables des scripteurs de l'époque et des caractéristiques phonétiques de chacun des patois concernés, on retrouve cette forme dans l'Aunis, la Loire, le Centre, le Saintonge, le Poitou, l'Anjou et possiblement d'autres régions septentrionales (Davau, 1979; Lorrain, 1876; Martellière, 1893; Ménière, 1880; Thibault, 1892; Jaubert, 1869; Rougé, 1906; Raymond, 2014). Toutes ces variations d'un même mot viennent du latin *pellis*, qui signifie « peau » (Goelzer, 1966). Cet étymon a généré quantité de mots en français standard comme en patois (citons *pelouse* (par analogie avec une surface couverte), *pelisse, peler, pelage, poil* et bien d'autres). Dans un dictionnaire œnologique moderne, on mentionne également *pelon* comme signifiant « tige d'osier utilisée [...] pour tresser les hottes et les paniers à vendange [...] » (C.A.V.E., 2013) (une entrée similaire, sous l'étiquette *pleyon*, apparaît dans la 2^e édition du *Dictionnaire de l'Académie française* (1777)).

Dès lors, il devient tout à fait plausible d'envisager que les colons, devant la similitude entre le <pelon> de leur pays natal et le *Dirca*, aient choisi de donner le même nom à ce dernier. Néanmoins, par souci de précision, il faut noter que les glossaires consultés dans le cadre de cette recherche recensent des usages du XVIII^e siècle, et il n'est pas certain que ces derniers

étaient attestés à l'époque de la colonisation. Cependant, leur diffusion dans plusieurs régions françaises est révélatrice d'une existence bien plus ancienne (confirmée par le manuscrit de Gaultier (1749), qui défend l'hypothèse H3).

Si l'équivalence entre <pelon> et *osier* devait être claire pour les Septentrionaux, il n'est pas certain que ce fût le cas pour les voyageurs venus d'ailleurs ou pour les premières générations nées en Nouvelle-France. La plupart des graphies de <pelon> n'incluent pas de –e muet (phonétiquement /ə/), ce qui porte à croire que le mot était prononcé [plɔ̃], tout comme *plomb* (métal). Le /ə/ a tendance à chuter en contexte inaccentué, ce qui est le cas pour un hypothétique */pəlɔ̃/. De surcroît, on retrouve des occurrences de *plom* (comme chez Nicolas) et de *plomb*, un homographe complet du nom du métal, dans les glossaires. Dès lors, le métal et le nom dialectal de l'osier étant de parfaits homonymes, il est raisonnable de croire que la confusion quant à la signification exacte de *bois de plomb* s'est installée chez toute personne n'étant pas familière avec la forme <pelon>. Il n'est pas sûr que Louis Nicolas sût si *plom* faisait référence au métal ou à l'osier : il était originaire d'Ardèche, région de langue d'oc, et n'était que de passage en Nouvelle-France (Gagnon, 2006).

Dans la *Relation par lettres de l'Amérique septentrionale* (probablement écrites par Antoine-Denis Raudot, un intendant de la colonie), on trouve une lettre de 1709 qui parle de l'arbrisseau en ces termes : « [...] les cordes qui servent de maître à ces filets sont faites d'ecorce de bois blanc ou de bois de plomb et sont fortes et difficiles à rompre » (De Rochemonteix, 1904). La lettre date de la même époque que l'*Histoire naturelle* de Nicolas. L'orthographe *plomb* choisie ici laisse planer un doute sur les intentions de l'auteur : il utilise la même graphie dans plusieurs autres lettres pour parler du métal.

Un autre document historique confirme cependant l'existence, déjà vers 1700, d'une confusion quant à la signification de *bois de plomb*. Il s'agit d'une ébauche de *Flore* résultant de la collaboration entre Michel Sarrazin, Sébastien Vaillant et Joseph Pitton de Tournefort. Le premier était un médecin du roi : il habita la Nouvelle-France dès 1685 et servit de correspondant à Vaillant et Tournefort, botanistes basés à Paris. Une copie de leurs notes communes a servi de base pour la publication de leur ouvrage inachevé, *Histoire des plantes de Canada*, par Bernard Boivin (1977), chercheur à l'Institut de Recherches Biosystématiques (Agriculture Canada). On retrouve dans cette édition une mention du *Dirca* : « *Envoy de 1700 no 36. [...] Cet arbrisseau s'élève de 4 à 5 pieds. Je ne sais pourquoy on l'appelle bois de plomb, car il est fort léger* ». Cette note est de Sarrazin. Il est manifeste qu'il ne se doutait pas de l'existence d'un homophone de *plomb*, soit l'une des formes de <pelon>, à plus forte raison parce qu'il était Bourguignon : la forme dialectale n'était pas utilisée dans sa région pour désigner l'osier. Il pensait donc certainement au métal, ce qui l'empêchait de comprendre la signification du nom.

Lamoureux (2002) et Marie-Victorin (1937) mentionnent que Tournefort utilisait *bois de plomb* dans une publication d'autour de 1700 (je n'ai pas retrouvé l'original). Ce dernier étant un botaniste influent à Paris à l'époque, il est probable que l'on reprît ses ouvrages pour des études subséquentes. Puisque Sarrazin n'avait formulé aucune hypothèse quant à l'étymologie du nom vernaculaire du *Dirca*, on peut supposer que Tournefort n'en avait pas ajouté dans sa propre description de la plante. Il y a donc longtemps que l'homophonie, puis l'homographie entre *plomb* et <pelon> sème la confusion chez les botanistes, qui n'ont d'ailleurs accès qu'à peu de sources de première main et qui se concentrent (on le comprend) davantage sur les caractéristiques des plantes que sur l'origine de leur nom vernaculaire.

Les éléments présentés jusqu'à maintenant abondent dans le sens de l'hypothèse H3. Qu'est-ce qui différencie H3 de H1? Un passage de l'introduction de la *Flore laurentienne* de Marie-Victorin (1935) me semble opportun pour expliquer la nuance :

Enfin, il y a une notable série de créations franchement canadiennes, imposées sans doute à des gens venus des provinces françaises de la plaine atlantique, par le contact quotidien avec des plantes dont le facies ne rappelait en rien les objets familiers de l'ancienne patrie. [...] [Le] génie poétique du peuple, génie descriptif et simpliste, naïf et direct, se donne libre cours: [...] Catherinettes, Hart rouge, Bois de plomb, Petits cochons [...].

Ce que croit Marie-Victorin, c'est que le nom *bois de plomb* a surgi de l'imagination des premiers colons, mis en contact avec une plante qui ne leur rappelait en rien celles de France. C'est aussi ce que présupposent La Galissonnière (ca. 1725) et *Avis et al.* (1967), puisqu'ils ne font aucune mention de l'existence de <pelon> comme autre nom de l'osier. Tous font d'ailleurs une mauvaise interprétation du sens de cette appellation : le premier y voit une forme impérative du verbe *peler*, alors que les seconds y voient un synonyme de *chauve* (d'où la mention « bald wood » dans l'entête). Brunet (1867), qui a la même théorie, ne donne pas assez d'informations au lecteur pour permettre de savoir ce qui lui avait permis d'arriver à ce raisonnement. L'hypothèse H3, en revanche, soutient que les colons se sont plutôt inspirés de ce qu'ils connaissaient pour donner un nom à une nouvelle plante : il s'agit d'un remarquable exemple de la propension de l'humain à recourir à l'analogie dans le langage.

L'hypothèse H2, quant à elle, ne tient plus debout dès lors que *bois de plomb* n'est pas une allusion au métal. Il en va de même pour H5. On serait tenté d'écartier H6 sur les mêmes bases : toutefois, ce qui la rend peu plausible est essentiellement un problème de dates. Si on s'en tient à la première mention écrite, *bois de plomb* existe depuis au moins 1685; or, le verbe *déplomber* est une création relativement moderne. Le *Grand Robert de la langue française* et

USITO s'entendent sur une apparition en 1838; or, le verbe tel que décrit dans ces dictionnaires signifie « retirer le plomb de quelque chose ». Ce n'est pas le sens évoqué par Marie-Victorin. J'ai donc eu recours au fichier lexical du Trésor de la langue française au Québec (Poirier *et al.*, 2006) pour vérifier si le mot *déplomber* apparaissait dans un des textes canadiens recensés dans la base de données (à titre d'exemple, *l'Histoire naturelle* de Nicolas y figure, de même que la *Flore laurentienne*). La seule occurrence est celle du texte de Marie-Victorin. Il est donc impossible que ce verbe relativement moderne (non recensé dans les ouvrages consultés, du moins pas au sens que lui donne Marie-Victorin) ait été à l'origine du nom *bois de plomb*.

En résumé, je postule, à l'instar de Cuvier *et al.* (1817) et de Gaultier (1749) que l'origine du nom *bois de plomb* remonte au latin *pellis* (« peau »), qui a engendré une forme <pelon> (« osier », de par la souplesse de l'écorce de cet arbuste), à graphie variable, dans un bon nombre de patois septentrionaux de France. Les colons venus peupler la Nouvelle-France provenaient surtout des régions où cette forme était répandue, et ils ont vraisemblablement donné le nom <pelon> (prononcé [plɔ̃], comme pour le métal) au *Dirca palustris* en voyant ses ressemblances avec l'osier. Il s'agirait donc d'un nom inspiré par l'analogie, et non d'une invention complète. Les autres hypothèses avancées dans la littérature partent du principe que *plomb* est une allusion au métal, alors qu'il s'agit d'une graphie alternative de <pelon>. Graduellement, avec la croissance de la colonie et la diminution du nombre de colons venus d'Europe, le sens original du mot a été perdu et l'homonymie a achevé de semer la confusion chez la plupart des auteurs (et probablement des habitants). Finalement, il faut envisager, de même que Marie-Victorin (1937) et Cuvier *et al.* (1937), que l'influence de l'anglais ait contribué, au fil du temps, à cristalliser l'impression que la graphie *plomb* / la prononciation

[plɔ̃] désignaient le métal, par analogie avec le nom vernaculaire anglais de la plante (*leatherwood*, possiblement prononcé *lead-wood* en débit rapide).

BIBLIOGRAPHIE

- ACADÉMIE FRANÇAISE (1777)**, *Dictionnaire de l'Académie françoise, nouvelle édition: tome second (L=Z)*, Avignon, Jacques Garrigan Imprimeur-Libraire, 634 p.
- BIGELOW, Jacob (1818)**, *American medical botany, being a collection of the native medicinal plants of the United States, containing their botanical history and chemical analysis, and properties and uses in medicine, diet and the arts, with coloured engravings*, Boston, Cummings and Hilliard, 791 p.
- BOIVIN, Bernard (1977)**, «La flore du Canada en 1708 », *Études Littéraires*, vol. 10, n°1 et 2 (avril/août), pp. 223-297.
- BRUNET, Louis-Ovide (abbé) (1867)**, *Catalogue des végétaux ligneux du Canada pour servir à l'intelligence des collections de bois économiques envoyées à l'exposition universelle de Paris, 1867*, Québec, C. Darveau Imprimeur-Éditeur, 64 p.
- C.A.V.E. (CLUB DES AMATEURS DE VINS EXQUIS) (2013)**, « Encyclopédie vinissime », *Club des amateurs de vins exquis*, [En ligne], URL: <http://www.cavesa.ch/encyclopedie> (page consultée le 30 janvier 2014)
- CUVIER, Frédéric et al. (1817)**, *Dictionnaire des sciences naturelles, dans lequel on traite méthodiquement des différens êtres de la nature, considérés soit en eux-mêmes, d'après l'état actuel de nos connoissances, soit relativement à l'utilité qu'en peuvent retirer la médecine, l'agriculture, le commerce et les arts. Siuvi d'une biographie des plus célèbres naturalistes. Ouvrage destiné aux médecins, aux agriculteurs, aux commerçans, aux artistes, aux manufacturiers, et à tous ceux qui ont intérêt à connoître les productions de la nature, leurs caractères génériques et spécifiques, leur lieu natal, leurs propriétés et leurs usages*, tome 5, Strasbourg – Paris, F.G. Levrault Éditeur – Le Normant, 627 p.
- DAVAU, Maurice (1979)**, *Le Vieux parler tourangeau: sa phonétique, ses mots et locutions, sa grammaire*, Chambray-les-Tours, C.L.D. Éditeur, 505 p.
- DE ROCHEMONTEIX, Camille (1904)**, *Relation par lettres de l'Amérique septentrionale (années 1709 et 1710)*, Paris, Letouzey et Ané éditeurs, LXIV-221 p.
- DOLLINGER, Stefan (dir.), Laurel J. BRINTON et Margery FEE (2013)**, *DCHP-1 Online: A Dictionary of Canadianisms on Historical Principles Online Based on Avis et al. (1967)*, DHCP, [En ligne], URL: <http://dchp.ca/DCHP-1/> (page consultée le 27 janvier 2014)
- DOYON, Pierre-Simon (2006)**, *L'iconographie botanique en Amérique française aux 17^e et 18^e siècles*, [En ligne], URL: https://oraprdnt.uqtr.quebec.ca/pls/public/gscw031?owa_no_site=504&owa_no_fiche=1&owa_aperçu=N&owa_imprimable=N&owa_bottin= (page consultée le 15 janvier 2014)
- GAULTIER, Jean-François (1749)**, *Description de plusieurs plantes du Canada par Mr Gauthier (Gaultier)*, manuscrit non publié, trouvé sur **BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES NATIONALES DU QUÉBEC (2014)**, *Bibliothèque et Archives nationales du Québec*, [En ligne], URL: <http://www.banq.qc.ca/> (page consultée le 11 avril 2014)
- GAGNON, François-Marc (2006)**, « À propos de Louis Nicolas », Bibliothèque et Archives Canada, [En ligne], URL: <http://www.collectionscanada.gc.ca/codex/026014-1200-f.html> (page consultée le 24 janvier 2014)

- GOVERNEMENT DU CANADA, (1858)**, *Relations des Jésuites contenant ce qui s'est passé de plus remarquable dans les missions des pères de la compagnie de Jésus dans la Nouvelle-France*, volume 1 (1611, 1626, 1632-1641), Québec, Augustin-Côté, éditeur-imprimeur, 992 p.
- GÆLZER, Henri (1966)**, *Dictionnaire latin-français*, Paris, Garnier Frères, 691 p.
- JAUBERT, Hippolyte-François (1869)**, *Glossaire du Centre de la France* (2^e éd.), Paris, France-expansion, 1024 p.
- LAMOUREUX, Gisèle (2002)**, *Flore printanière*, Québec, Fleurbec éditeur, 576 p.
- LORRAIN, D. (1876)**, *Glossaire du patois messin*, Nancy, Nidot Frères Libraire, 63 p.
- MARIE-VICTORIN (frère) (1935)**, *Flore laurentienne*, Montréal, Imprimerie de La Salle, 919 p.
- (1937), « Le bois de plomb », *Bibliothèque des jeunes naturalistes*, Montréal, Société canadienne d'histoire naturelle, tract n° 36, 4 p.
- MARTEL, Pierre et Hélène CAJOLET-LAGANIÈRE (dir.) (2014)**, *USITO : Parce que le français ne s'arrête jamais*, [En ligne], URL : <https://www.usito.com/dictio> (page consultée le 27 février 2014)
- MARTELLIÈRE, Paul (1893)**, *Glossaire du vendômois*, Orléans, Herluison éditeur, 408 p.
- MARTINEAU, France (2005)**, « Perspectives sur le changement linguistique: aux sources du français canadien », *Revue canadienne de linguistique*, vol. 50, n° 1/2/3/4, pp. 173-213.
- MICHELANT, H. et A. RAMÉ (1867)**, *Relation originale du voyage de Jacques Cartier au Canada en 1534 – Documents inédits sur Jacques Cartier et le Canada (nouvelle série)*, Paris, Librairie Tross, 140 p., trouvé sur **BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DE FRANCE**, *Gallica : Bibliothèque numérique*, [En ligne], URL : <http://gallica.bnf.fr/> (page consultée le 13 février 2014)
- MÉNIÈRE, Charles (1880)**, *Glossaire angevin étymologique comparé avec différents dialectes*, Angers, Commission archéologique dépendante de la Société Impériale d'Agriculture, Science et Art d'Angers, 561 p.
- MORIN, Yves-Charles (2002)**, « Les premiers immigrants et la prononciation du français au Québec », *Revue québécoise de linguistique*, vol. 31, n° 1, pp. 39-78.
- MUMA, Walter (2014)**, *Leatherwood (Dirca Palustris)*, Ontario Trees & Shrubs, [En ligne], URL: <http://ontariotrees.com/main/species.php?id=2056> (page consultée le 22 janvier 2014)
- NICOLAS, Louis (ca. 1685)**, *Histoire naturelle ou la fidelle recherche de tout ce qu'il y a de rare dans les Indes occidentales: ou il est traité en general, et en particulier Des simples, des fleurs, des grains, des herbes, des fruits, des arbrisseaux, des grands arbres, des animaux à 4 pieds terrestres, et aquatiques, des oyzeaux qui vivent sur La terre; et de ceux qui vivent dessus: ou dedans leau; et enfin des poissons d'eau douce, et de quelques uns dela salée. de divers insectes, et de plusieurs reptiles, avec leurs figures. Divizé en douze livres*, manuscrit, 166 p., trouvé sur **BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DE FRANCE**, *Gallica : Bibliothèque numérique*, [En ligne], URL : <http://gallica.bnf.fr/> (page consultée le 13 février 2014)
- POIRIER, Claude et al. (2011)**, « Fichier lexical du TLFQ », *Trésor de la langue française au Québec*, [En ligne], URL: <http://www.tlfq.ulaval.ca/fichier/> (page consultée le 19 janvier 2014)
- RAYMOND, Jean-Claude (2014)**, *La Langue de Rabelais et le parler du sud de la Touraine et du Loudunais*, [En ligne], URL: <http://jcraymond.free.fr/Celebrities/R/Rabelais/Glossaire/Langue.php#mozTocId710847> (page consultée le 20 janvier 2014)
- REY, Alain (dir.) (2014)**, *Le Grand Robert de la langue française*, [En ligne], URL : <http://gr.bvdep.com/> (page consultée le 27 février 2014)

ROUGÉ, Jacques (1906), « Traditions populaires de la Touraine méridionale : principales expressions traditionnelles du parler bas-tourangeau », *La Gazette médicale du Centre*, décembre 1906, pp. 363-364.

THIBAUT, Adrien (1892), *Glossaire du pays blaisois*, Orléans, Herluison éditeur, 406 p.