

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

MARIANNE PIOCHON

**ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ESPÈCES VÉGÉTALES DE LA FLORE LAURENTIENNE:  
COMPOSITION CHIMIQUE, ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES ET HÉMI-SYNTHÈSE.**

Août 2008



### Mise en garde/Advice

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

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

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

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

## RÉSUMÉ

Au Québec, le potentiel pharmacologique des huiles essentielles issues de plantes de la flore laurentienne a été très peu étudié. Dans ce contexte et en tenant compte du savoir médicinal des autochtones, les chercheurs du laboratoire LASEVE de l'UQAC étudient leur potentiel pharmacologique ainsi que celui de leurs constituants volatils. Dans cette optique, ce projet de maîtrise visait à évaluer les activités anticancéreuse, antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique et antibactérienne de plusieurs huiles essentielles issues de plantes de la forêt boréale. Suite à ce criblage biologique, l'huile essentielle de bourgeons de peuplier baumier s'est remarquablement distinguée des autres espèces de par son activité anticancéreuse ( $IC_{50}$  12-16  $\mu\text{g/mL}$ ). Une étude approfondie de la composition chimique de cette huile essentielle a donc été entreprise à partir de bourgeons récoltés à différentes périodes de l'année. Le composé majoritaire, l' $\alpha$ -bisabolol, un alcool sesquiterpénique bien connu pour sa non-toxicité, a été identifié et dosé dans chaque huile essentielle. Une activité cytotoxique marquée envers les lignées cancéreuses de poumon (A549) et de côlon (DLD-1) a été observée pour ce composé ( $IC_{50}$  18 et 26  $\mu\text{g/mL}$ ). L' $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside, un sesquiterpène glycosidé naturel, a été synthétisé avec cinq autres glycosides d' $\alpha$ -bisabolol ( $\beta$ -D-glucoside,  $\beta$ -D-galactoside,  $\beta$ -D-xyloside,  $\alpha$ -L-rhamnoside et  $\alpha$ -D-mannoside). Pour la première fois, la synthèse de glycosides d'un sesquiterpène selon la procédure inverse de Schmidt a été réalisée et avec d'excellents rendements (83-95%). Leur activité anticancéreuse a été évaluée contre un large éventail de cellules cancéreuses. Dans la plupart des cas, l'addition d'une section sucre a eu pour effet d'améliorer l'activité cytotoxique de l' $\alpha$ -bisabolol. Parmi les six glycosides synthétisés, l' $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside a exercé la plus forte cytotoxicité ( $IC_{50}$  40-64  $\mu\text{M}$ ) surpassant celle de la molécule initiale. Par ailleurs, au cours de ce projet, l'huile essentielle des fleurs de *Solidago puberula* a également été étudiée car son profil chimique n'avait jamais été établi. Une activité anticancéreuse modérée a été détectée pour cette huile essentielle ( $IC_{50}$  DLD-1:  $30 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ ).

Une autre partie importante de ce projet visait à étudier la composition et le potentiel pharmacologique des hydrolats, produits secondaires obtenus lors de l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau. Les hydrolats ont en effet été très peu étudiés. Pour la première fois, la composition chimique de plusieurs hydrolats a été analysée ainsi que leur activité biologique. Ainsi, l'hydrolat de bourgeons de *Populus balsamifera* a démontré une activité antioxydante intéressante à l'aide du test chimique ORAC ( $23 \pm 10 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ). Ceux de *Solidago puberula* et *Monarda didyma* ont démontré une activité anti-inflammatoire intéressante en inhibant fortement le relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages murins stimulés avec une molécule induisant l'inflammation (LPS).

Au final, les résultats de ce projet de maîtrise auront permis de mettre en évidence le potentiel thérapeutique des huiles essentielles et hydrolats de plantes de la flore laurentienne et d'ouvrir la voie à de futures études.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur André Pichette pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) et confiée un projet tout aussi passionnant. Je remercie également mon co-directeur, le professeur Jean Legault, responsable de l'équipe biochimie du LASEVE, pour avoir permis de réaliser l'interface avec le domaine de la pharmacologie.

Au LASEVE je remercie:

Hélène Gagnon (assistante de recherche du professeur André Pichette) pour ses nombreux conseils pratiques dans le domaine des huiles essentielles.

Serge Lavoie (assistant de recherche du professeur André Pichette) pour toute l'aide qu'il m'a apportée que ce soit au niveau de la chimie, de l'analyse et de l'informatique.

Maxime Lebrun et Catherine Dussault (assistants de recherche du professeur Jean Legault) pour avoir effectué les tests de bioactivité.

Phillipe Dufour (étudiant à la maîtrise) et Jimmy bouchard (chercheur post-doctoral) pour leur soutien dans le domaine de la synthèse organique.

Charles Gauthier (étudiant au doctorat) qui, tout au long de ma maîtrise, m'a beaucoup encouragée et soutenue.

Tous mes collègues du LASEVE avec qui se fût un réel plaisir de travailler au cours de ces trois années passées à Chicoutimi.

Pour terminer, je souhaite remercier avec une attention toute particulière mes parents, Noëlle et Gérard Piochon qui, malgré la distance, ont toujours su me reconforter et me conseiller durant mes études à Chicoutimi.

**TABLE DES MATIÈRES**

Résumé .....	i
Remerciements .....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des annexes .....	xi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2. LES HUILES ESSENTIELLES.....	5
2.1. Les procédés d'extraction.....	5
2.1.1. La distillation.....	5
2.1.2. Extraction par micro-ondes.....	7
2.1.3. Extraction par solvants et par les graisses.....	9
2.1.4. Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	9
2.2. Composition.....	11
2.2.1. Les composés volatils des huiles essentielles.....	11
2.2.2. Les chémotypes.....	14
2.2.3. Les facteurs influençant la composition.....	15
2.3. Les activités biologiques et pharmacologiques.....	16
2.3.1. La toxicité des huiles essentielles.....	16
2.3.2. Activités biologiques.....	17

2.3.3. Activités pharmacologiques.....	19
CHAPITRE 3. LES HYDROLATS.....	23
3.1. Considérations générales.....	23
3.2. Composition.....	24
3.3. Activités biologiques et pharmacologiques.....	27
3.3.1. Activité antibactérienne.....	27
3.3.2. Activité antifongique.....	29
3.3.3. Activité pharmacologique.....	30
3.4. Conclusion.....	31
CHAPITRE 4. SESQUITERPÈNES ET GLYCOSIDES DE VOLATILS ANTICANCÉREUX :	
LE CAS DE L'α-BISABOLOL.....	33
4.1. L'α-bisabolol.....	33
4.2. La barrière hémato-encéphalique.....	36
4.3. Les composés volatils glycosidés.....	40
4.4. Synthèse des glycosides de volatils.....	43
4.5. Potentiel pharmacologique des glycosides de volatils.....	45
CHAPITRE 5. ARTICLE: "CHEMICAL COMPOSITION AND ANTICANCER ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM <i>POPULUS BALSAMIFERA</i> BUDS" .....	46
CHAPITRE 6. ARTICLE: "EFFICIENT SYNTHESIS AND CYTOTOXIC EVALUATION OF NATURAL α-BISABOLOL β-D-FUCOPYRANOSIDE AND ANALOGUES" .....	66
CHAPITRE 7. ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET.....	100
7.1. Criblage biologique des huiles essentielles de plantes de la flore laurentienne.....	100

7.1.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse (GC-FID).....	101
7.1.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse (GC-MS) .....	102
7.1.3. Identification des composés .....	102
7.1.4. Tests biologiques .....	102
7.1.5. Résultats des tests d'activités.....	104
7.1.5.1. Activité anticancéreuse.....	104
7.1.5.2. Activité antifongique.....	106
7.1.5.3. Activité antibactérienne.....	107
7.1.5.4. Activité antioxydante.....	108
7.1.5.5. Conclusion.....	109
7.2. <i>Solidago puberula</i> .....	110
7.2.1. Huile essentielle de <i>Solidago puberula</i> .....	111
7.2.1.1. Extraction.....	111
7.2.1.2. Composition.....	112
7.2.1.3. Activité anticancéreuse.....	114
7.2.1.4. Activité anti-inflammatoire.....	115
7.2.2. Hydrolat de <i>Solidago puberula</i> .....	116
7.2.2.1. Extraction.....	116
7.2.2.2. Composition.....	117
7.2.2.3. Activité anti-inflammatoire.....	119
7.2.3. Extraits aux solvants de <i>Solidago puberula</i> .....	121
7.2.3.1. Extraction.....	121

7.2.3.2. Activités anticancéreuse et anti-inflammatoire.....	121
7.3. Hydrolat de <i>Populus balsamifera</i> .....	123
7.3.1. Extraction.....	123
7.3.2. Composition.....	123
7.3.3. Activité antioxydante.....	125
7.4. <i>Monarda didyma</i> .....	125
7.4.1. Huile essentielle de <i>Monarda didyma</i> .....	126
7.4.1.1. Extraction.....	126
7.4.1.2. Composition.....	127
7.4.1.3. Activité antioxydante.....	129
7.4.2. Hydrolat de <i>Monarda didyma</i> .....	130
7.4.2.1. Extraction.....	130
7.4.2.2. Composition.....	130
7.4.2.3. Activité anti-inflammatoire.....	132
CHAPITRE 8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES.....	135
Bibliographie.....	139
Annexes.....	156

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur.....	6
<b>Figure 2.</b> Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	8
<b>Figure 3.</b> Différence de sélectivité entre trois méthodes d'extraction .....	11
<b>Figure 4.</b> Exemples de structures de monoterpènes.....	12
<b>Figure 5.</b> Exemples de structures de sesquiterpènes.....	13
<b>Figure 6.</b> Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane.....	13
<b>Figure 7.</b> Exemples de structures de composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes.....	14
<b>Figure 8.</b> Comparaison de la composition d'une huile essentielle et de l'hydrolat correspondant.....	26
<b>Figure 9.</b> Structure chimique des menthanes diols.....	31
<b>Figure 10.</b> Structure chimique de l' $\alpha$ -bisabolol.....	34
<b>Figure 11.</b> Synthèse de l' $\alpha$ -bisabolol à partir du linalol.....	35
<b>Figure 12.</b> Synthèse de l' $\alpha$ -bisabolol à partir du cétydiène.....	35
<b>Figure 13.</b> Images de tumeurs cérébrales obtenues par résonance magnétique nucléaire.....	36
<b>Figure 14.</b> Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.....	38
<b>Figure 15.</b> Exemples de sesquiterpènes glycosidés naturels.....	42
<b>Figure 16.</b> <i>Carthamus lanatus</i> et l' $\alpha$ -bisabolol- $\beta$ -D-fucopyranoside.....	43
<b>Figure 17.</b> Synthèse de glycosides de volatils utilisant un processus enzymatique.....	44

<b>Figure 18.</b> Synthèse de dérivés glycosidés de monoterpénols selon la méthode de Koenigs-Knorr.....	44
<b>Figure 19.</b> Photo et schéma de la <i>Solidago puberula</i> .....	110
<b>Figure 20.</b> Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Solidago puberula</i> .....	113
<b>Figure 21.</b> A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'huile essentielle de <i>S. puberula</i> .....	116
<b>Figure 22.</b> Structure des composés majoritaires de l'hydrolat de <i>Solidago puberula</i> .....	119
<b>Figure 23.</b> A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'hydrolat de <i>Solidago puberula</i> .....	119
<b>Figure 24.</b> A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité du 2-méthoxy-4-vinylphénol.....	120
<b>Figure 25.</b> A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'extrait au dichlorométhane de <i>Solidago puberula</i> .....	122
<b>Figure 26.</b> Structure des composés majoritaires de l'hydrolat de <i>Populus balsamifera</i> .....	125
<b>Figure 27.</b> Photo de <i>Monarda didyma</i> .....	126
<b>Figure 28.</b> A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'hydrolat de feuilles et de fleurs de <i>Monarda didyma</i> .....	133

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Variation de la composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum gratissimum</i> en fonction de l'heure de la récolte.....	16
<b>Tableau 2.</b> Activité antibactérienne d'hydrolats d'épices contre des bactéries pathogènes.....	28
<b>Tableau 3.</b> Activité antifongique d'hydrolats de cinq épices.....	29
<b>Tableau 4.</b> Valeurs optimales des paramètres physicochimiques relatifs à la diffusion au travers de la BHE.....	39
<b>Tableau 5.</b> Plantes sélectionnées pour le criblage biologique.....	101
<b>Tableau 6.</b> Activité anticancéreuse des huiles essentielles des plantes sélectionnées.....	105
<b>Tableau 7.</b> Activité antifongique des huiles essentielles des plantes sélectionnées.....	106
<b>Tableau 8.</b> Activité antibactérienne des huiles essentielles des plantes sélectionnées.....	107
<b>Tableau 9.</b> Activité antioxydante des huiles essentielles des plantes sélectionnées.....	108
<b>Tableau 10.</b> Composition chimique de l'huile essentielle des sommités florales de <i>Solidago puberula</i> .....	112
<b>Tableau 11.</b> Activité anticancéreuse de l'huile essentielle de <i>Solidago puberula</i> .....	114
<b>Tableau 12.</b> Composition chimique de l'hydrolat de <i>Solidago puberula</i> .....	117
<b>Tableau 13.</b> Données d'extraction aux solvants des sommités forales de <i>Solidago puberula</i> ...	121
<b>Tableau 14.</b> Activité anticancéreuse des extraits de <i>Solidago puberula</i> .....	121
<b>Tableau 15.</b> Composition chimique de l'hydrolat de bourgeons de <i>Populus balsamifera</i> .....	123
<b>Tableau 16.</b> Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>Monarda didyma</i> .....	127
<b>Tableau 17.</b> Composition chimique de l'huile essentielle de fleurs de <i>Monarda didyma</i> .....	128

<b>Tableau 18.</b> Composition chimique de l'hydrolat de feuilles de <i>Monarda didyma</i> .....	130
<b>Tableau 19.</b> Composition chimique de l'hydrolat de fleurs de <i>Monarda didyma</i> .....	131

**LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe 1.</b> Composition des huiles essentielles des plantes sélectionnées.....	156
<b>Annexe 2.</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des glycosides d' $\alpha$ -bisabolol.....	176

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle [Robert, 2000]. Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux [Sell, 2006]. Puis progressivement, les huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles. En guise d'exemple, à l'époque des grandes épidémies dans la Grèce Antique, les principes odorants de certaines plantes aromatiques étaient répandus par fumigation dans les rues des villes pour combattre la propagation des maladies infectieuses. La fumigation des personnes malades est en effet l'une des plus anciennes techniques thérapeutiques [Buchbauer *et al.*, 1993]. Plus tard en France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient en contact

quotidiennement avec des huiles essentielles, résistaient de manière quasi-absolue aux épidémies de toutes sortes [Vanier, 1994].

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques [Pauli, 2001]. Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes aux fléaux actuels, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles, car un nombre non négligeable de composés volatils, tels que les sesquiterpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer [Modzelewska *et al.*, 2005]. Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives (voir chapitres 2 et 4).

Lors du processus d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, un sous produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'entraînement des composés volatils. Cette eau, appelée hydrolat, contient en faible quantité des molécules odorantes de la plante ainsi que des composés plus polaires non retrouvés dans l'huile essentielle. Les hydrolats sont considérés la plupart du temps comme un déchet de l'hydrodistillation. Pourtant, certains hydrolats de plantes possèdent des propriétés thérapeutiques intéressantes et bien souvent différentes de celles de l'huile essentielle correspondante [Catty, 2001; Price *et al.*, 2004]. L'hydrolat de *Hamamelis virginiana*, par exemple, est un composant fréquent des produits dermatologiques en raison de ses propriétés désinfectantes et astringentes [Bremness, 1996]. Malgré cela, la communauté scientifique ne s'y

intéresse que très peu. La composition chimique et les propriétés biologiques des hydrolats constituent donc un sujet de recherche qui reste à explorer (voir chapitre 3).

En Amérique du Nord, les peuples ancestraux savaient bien utiliser les ressources offertes par la forêt boréale comme remèdes pour se soigner. C'est en se basant sur le savoir acquis au fil des siècles par les amérindiens que les professeurs André Pichette et Jean Legault, du laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi ont découvert en 2003 un nouvel agent anticancéreux: l' $\alpha$ -humulène, un sesquiterpène présent dans l'huile essentielle d'*Abies balsamea* [Legault *et al.*, 2003]. Suite à cette découverte, le laboratoire LASEVE a consacré une grande partie de ses efforts à l'étude du potentiel pharmaceutique contenu dans la biomasse de la forêt boréale, d'autant plus que cette pharmacopée n'a fait l'objet que de peu d'études dans ce domaine. Ainsi, le potentiel thérapeutique des huiles essentielles issues de plantes de la forêt boréale reste à explorer.

C'est dans cette optique que se situe ce projet de maîtrise dont les objectifs principaux peuvent se résumer ainsi:

- Extraire les huiles essentielles d'un grand nombre de plantes de la flore laurentienne et déterminer leur composition chimique;
- Évaluer, *in vitro*, les activités pharmacologiques (anticancéreuse, antifongique, antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne);
- Identifier le ou les composés responsables de l'activité globale de l'huile essentielle;
- Synthétiser des dérivés du composé actif en vue d'améliorer son efficacité thérapeutique.

Ce mémoire de maîtrise comporte huit chapitres. Ce premier chapitre décrivait le contexte global de ce projet ainsi que les différents objectifs à atteindre. Le chapitre 2 dresse une revue de littérature sur les huiles essentielles. Les procédés d'extraction, la composition et les propriétés biologiques et pharmacologiques y sont présentés. Le troisième chapitre est consacré aux hydrolats, sous-produits obtenus lors du processus d'obtention des huiles essentielles par entraînement à la vapeur. Une revue de la littérature concernant les sesquiterpènes glycosidés est présentée au chapitre 4. L'accent est mis sur leur intérêt dans la recherche de nouveaux agents anticancéreux. En guise d'exemple, l' $\alpha$ -bisabolol, un alcool sesquiterpénique ayant une activité *in vitro* antigliomale intéressante est présenté. Le deux chapitres suivants comportent les manuscrits présentant les principaux résultats obtenus à l'issue de ce projet de maîtrise. Le chapitre 5 contient le manuscrit présentant les résultats relatifs à l'huile essentielle des bourgeons de *Populus balsamifera*: l'activité anticancéreuse de l'huile essentielle est reportée ainsi que sa composition chimique. Le chapitre 6 comporte l'article qui présente la synthèse de dérivés glycosidés du composé majoritaire de l'huile essentielle de *Populus balsamifera*, l' $\alpha$ -bisabolol, ainsi que l'étude de leur activité anticancéreuse. Ensuite, le chapitre 7 établit l'état d'avancement du projet, c'est-à-dire tous les résultats intéressants obtenus au cours de ces deux années de maîtrise dont certains pourront faire l'objet d'une publication. Finalement, le chapitre 8 dresse les conclusions du projet de recherche ainsi que les perspectives futures.

## CHAPITRE 2

### LES HUILES ESSENTIELLES

#### 2.1. Les procédés d'extraction

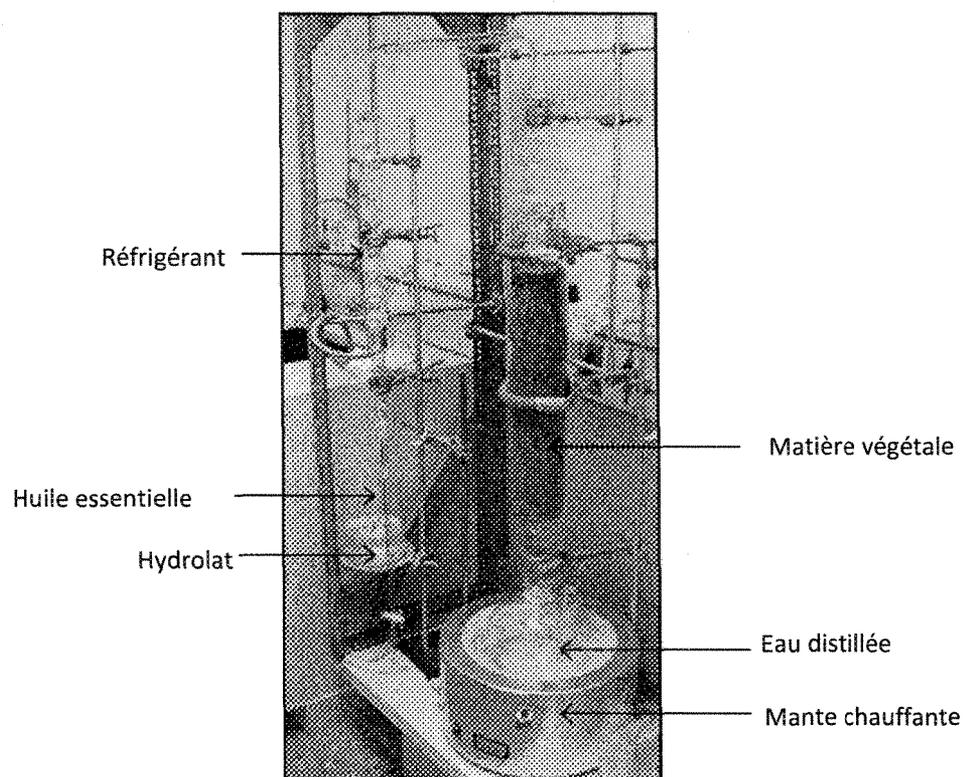
##### 2.1.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [Franchomme *et al.*, 1990]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

Tout d'abord, l'hydrodistillation (*water distillation*). Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les

vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

Ensuite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*steam distillation*). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Figure 1).



**Figure 1.** Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur (LASEVE)

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité

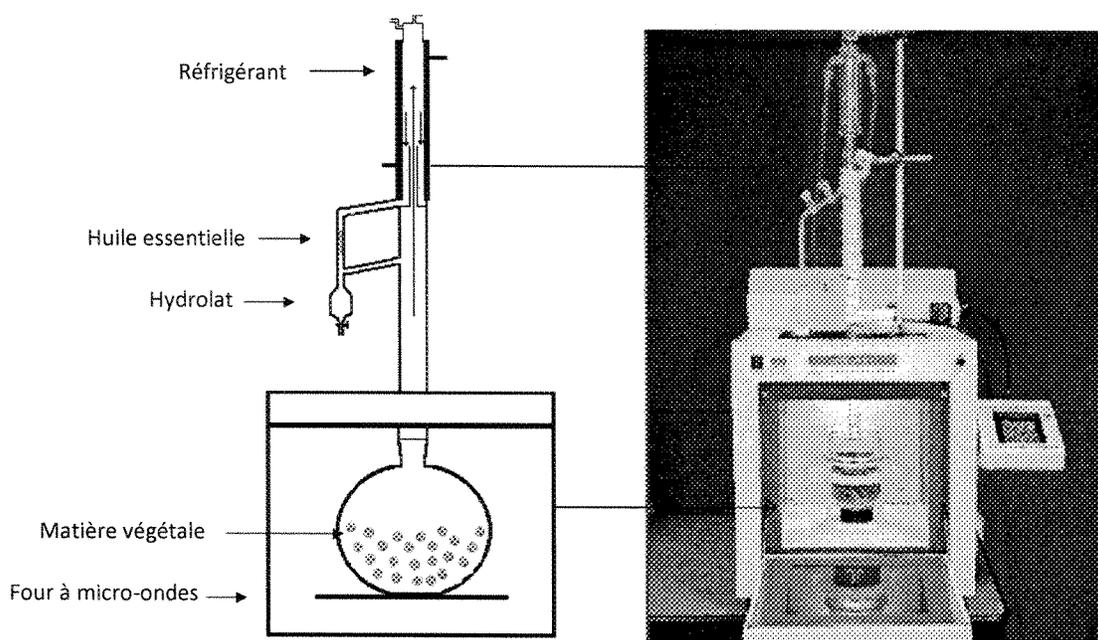
de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [Franchomme *et al.*, 1990].

Enfin, la troisième technique est l'hydrodiffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*per descendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » [Franchomme *et al.*, 1990 ; Richard, 1992].

### **2.1.2. Extraction par micro-ondes**

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 2). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante [Mengal *et al.*, 1993]. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de

composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées [Bendahou *et al.*, 2007; Lucchesi *et al.*, 2007]. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [Mengal *et al.*, 1993; Lucchesi *et al.*, 2004]. L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [Chemat *et al.*, 2006 ; Flamini *et al.*, 2007; Lucchesi *et al.*, 2007].



**Figure 2.** Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes [Lucchesi *et al.*, 2007]

### **2.1.3. Extractions par les solvants et par les graisses**

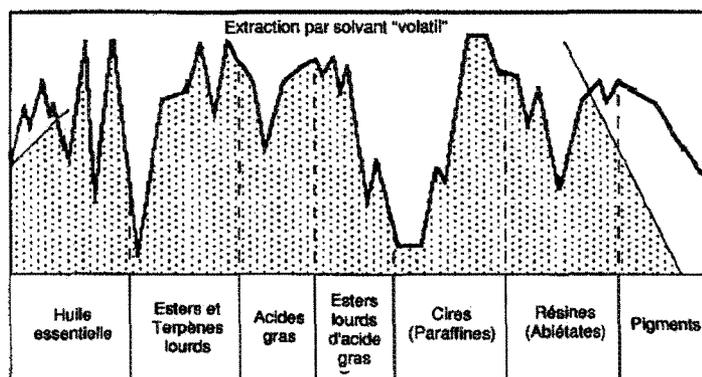
Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Figure 3) [Richard, 1992; Robert, 2000]. Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [Proust, 2006]. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [Bruneton, 1999].

### **2.1.4. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique**

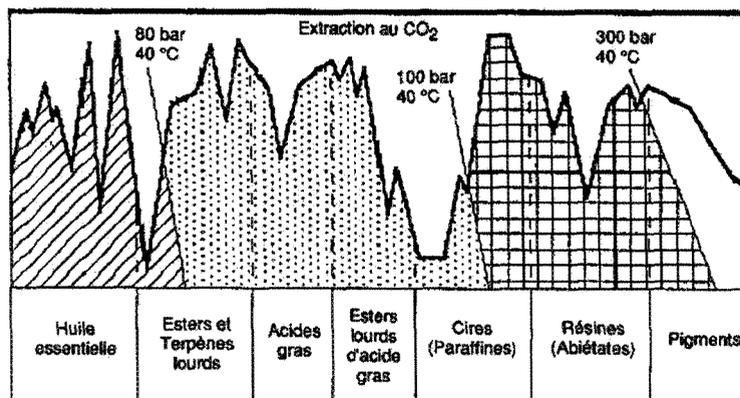
L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO<sub>2</sub> supercritique. Au-delà du point critique ( $P = 73,8\text{ bars}$  et  $T = 31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), le CO<sub>2</sub> possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le

CO<sub>2</sub> supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation [Pellerin, 1991]. En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (Figure 3) [Richard, 1992]. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité [Wenqiang *et al.*, 2007] et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante. La figure 3 illustre la différence de sélectivité entre les trois techniques d'extractions mentionnées: l'hydrodistillation, l'extraction par solvants et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique.

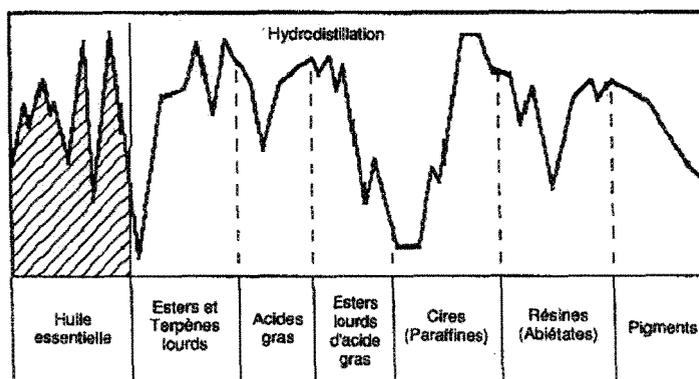
**Schéma représentant la fraction extraite par un solvant "volatil" (zone pointillée)**



**Schéma représentant les fractions extraites par le dioxyde de carbone à 40 °C**  
 A 80 bar : zone hachurée ; à 100 bar : zones hachurée et pointillée ;  
 à 300 bar : zones hachurée, pointillée et quadrillée.



**Schéma représentant la fraction extraite par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur (zone hachurée)**



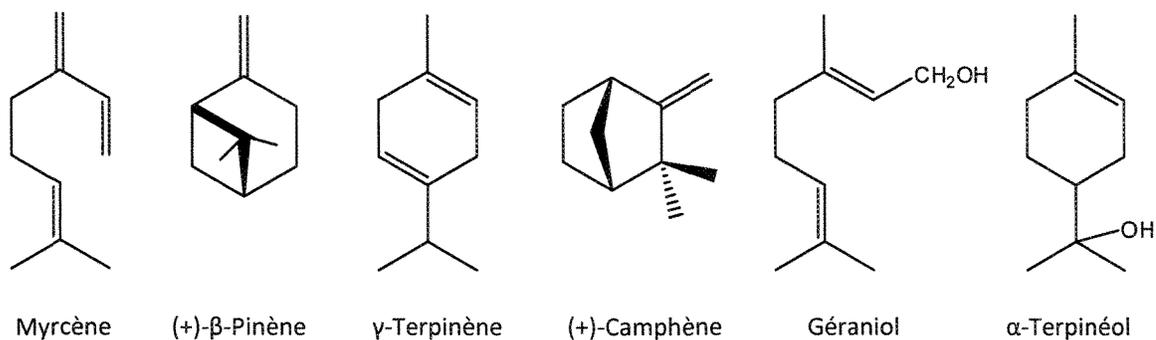
**Figure 3.** Différence de sélectivité entre trois méthodes d'extraction [Richard, 2000]

## 2.2. Composition

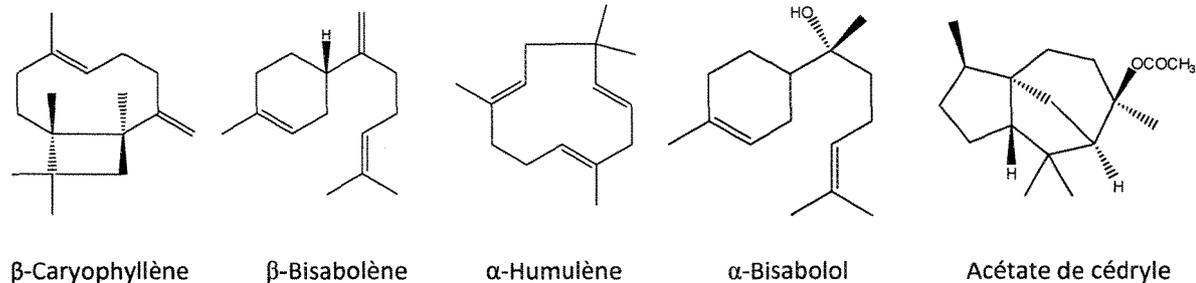
### 2.2.1. Les composés volatils des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents [Sell, 2006]. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la

masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène, etc.) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène, etc.). Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » ( $C_5H_8$ ), soit deux unités pour les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ) et trois pour les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ). Exceptionnellement, quelques diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [Vila *et al.*, 2002]. Plusieurs milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont, à ce jour, été identifiés dans les huiles essentielles [Modzelewska *et al.*, 2005]. La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol,  $\alpha$ -bisabolol), des cétones (menthone,  $\beta$ -vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' $\alpha$ -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc. (Figure 4 et 5).

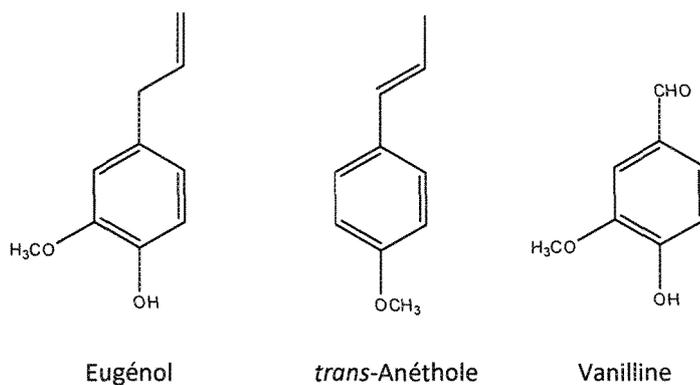


**Figure 4.** Exemples de structures de monoterpènes



**Figure 5.** Exemples de structures de sesquiterpènes

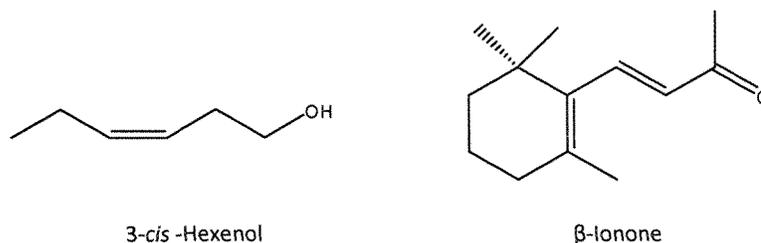
Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure 6) [Kurkin, 2003]. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénole, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. [Bruneton, 1999].



**Figure 6.** Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites molécules odorantes, comme par exemple le (3Z)-

hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique) [Bruneton, 1999].



**Figure 7.** Exemples de structures de composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes

### 2.2.2. Les chémotypes

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, l' $\alpha$ -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol [Thompson *et al.*, 2003]. Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum vulgare* [Mockute *et al.*, 2001], *Mentha spicata* [Edris *et al.*, 2003] en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. Ainsi, la méconnaissance des chémotypes peut parfois être à l'origine d'accidents graves. L'absinthisme (intoxication à l'absinthe) en est un exemple frappant: l'*Artemisia absinthium* qui était récolté dans la région parisienne dans le but de confectionner le fameux apéritif contenait l' $\alpha$ -thujone, molécule fortement neurotoxique, comme

composé majoritaire à 45%, alors que celle présente dans les régions alpines (d'où, d'ailleurs, la boisson est originaire) ne présentait qu'un taux de 3% en  $\alpha$ -thujone. L'alcool préparé avec cette dernière était sans danger pour l'organisme [Franchomme *et al.*, 1990].

### 2.2.3. Les facteurs influençant la composition

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques. Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne [Bruneton, 1999]. Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses [Assad *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1997]. L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants. À titre d'exemple, il a été démontré que, la composition de l'huile essentielle de feuilles d'*Ocimum gratissimum*, varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Tableau 1) [Vasconcelos *et al.*, 1999].

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les *Citrus* par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée [Bruneton, 1999]. Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en huile essentielle sous l'effet de fertilisants [Alvarez-Castellanos *et al.*, 2003].

**Tableau 1.** Variation de la composition de l'huile essentielle d'*Origanum gratissimum* en fonction de l'heure de la récolte [Vasconcelos *et al.*, 1999]

Constituants	Heure de récolte										
	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00
$\beta$ -Pinène	3,7	-	-	-	-	-	-	2,0	-	2,7	1,3
Myrcène	1,6	-	1,0	-	-	-	-	-	-	0,8	-
1,8-Cinéole	52,1	32,4	27,4	7,1	-	2,5	-	60,7	32,5	75,5	22,5
Linalol	1,5	-	7,9	-	-	1,4	-	-	-	1,0	-
4-Terpinéol	0,6	-	2,3	-	-	2,5	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Terpinéol	1,1	-	1,8	-	-	1,8	-	-	-	-	-
Eugénol	14,0	32,4	29,0	90,6	98,0	91,9	80,3	27,5	67,0	11,4	39,5
$\beta$ -Élémène	0,4	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Caryophyllène	4,4	-	1,3	-	-	-	7,9	2,9	-	-	11,6
$\beta$ -Maaliène	4,8	-	12,2	-	-	-	11,5	2,4	-	-	13,4

### 2.3. Les activités biologiques et pharmacologiques

Les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles sont utilisés depuis fort longtemps par les anciennes civilisations pour soigner les pathologies courantes. Aujourd'hui, après avoir été délaissées un temps soit peu par la médecine, le potentiel thérapeutique des huiles essentielles et de leurs constituants volatils est reconsidéré et les études qui leurs sont consacrées abondent dans la littérature scientifique.

#### 2.3.1. La toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie.

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde [Smith *et al.*, 2000]) ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines [Naganuma *et al.*, 1985]). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. Les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux [Franchomme *et al.*, 1990]. Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers [Homburger *et al.*, 1968]. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le safrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), la  $\beta$ -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs [Wiseman *et al.*, 1987]. Le safrole et l'estragole, par exemple, sont métabolisés par les microsomes au niveau du foie des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines [Kim *et al.*, 1999]. Toutefois, ces résultats sont controversés car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrole, par exemple, est métabolisé chez l'humain en dihydroxysafrole et trihydroxysafrole non cancérigènes [Franchomme *et al.*, 1990]. De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal est loin de correspondre à celle qu'un homme est susceptible d'ingérer par jour [Guba, 2001].

### **2.3.2. Activités biologiques**

Les plantes aromatiques et épices sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs

propriétés antibactériennes et antifongiques. Origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous. Reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches et l'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* [Pauli, 2001; Fabian *et al.*, 2006]. D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes: certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellal, néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes ( $\gamma$ -terpinène, *p*-cymène). Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatisants naturels. De ce fait, beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation [Burt, 2004]. La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et bien d'autres [Kalemba *et al.*, 2003].

Avec l'émergence de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les huiles essentielles antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses. Beaucoup de groupes de recherche ont étudié, par exemple, l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* contre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline («methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*» ou MRSA) [Dryden *et al.*, 2004, Chan *et al.*, 1998, Carson *et al.*, 1995.]. Cette huile, dont le composé majoritaire est le terpinèn-4-ol, a montré de très bons résultats *in vitro* contre la prolifération de MRSA. Toutefois, son efficacité en milieu clinique demeure contestée [Flaxman, 2005].

### **2.3.3. Activités pharmacologiques**

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'alzheimer [Butterfield, 2002], l'artériosclérose et le cancer [Gardner, 1997]. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C,  $\alpha$ -tocophérol, BHT, etc.) [Béliveau, 2005]. Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants [Edris, 2007]. Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes [Braga *et al.*, 2006]. L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones,

et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le gèranial/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes:  $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène et l' $\alpha$ -terpinolène [Edris, 2007].

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite [Maruyama *et al.*, 2005]. Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* [Koh *et al.*, 2002; Caldefie-Chézet *et al.*, 2004; Caldefie-Chézet *et al.*, 2006] et de son composé principal, l' $\alpha$ -terpinéol [Hart *et al.*, 2000]. Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de gèranium [Maruyama *et al.*, 2005] ainsi que le linalol et son acétate [Peana *et al.*, 2002] ont montré une activité anti-inflammatoire sur des œdèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires.

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux [Edris, 2007].

Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer [Béliveau *et al.*, 2006].

Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimiopréventive a été mise en évidence. L'huile essentielle d'ail, par exemple, est une bonne source de composés sulfurés [Pyun *et al.*, 2006] reconnus pour leur effet préventif contre le cancer [Milner, 2001; Milner, 2006]. Le diallyl sulfide, diallyl disulfide et le diallyl trisulfide en sont des exemples. Ces composés activent, chez le rat, les enzymes intervenant dans le processus de détoxification hépatique de phase I (désagrégation des liaisons chimiques qui relient les toxines carcinogènes les unes aux autres) et de phase II (liaisons des toxines libérées à des enzymes détoxifiantes telle la glutathione S-transférase) [Wu *et al.*, 2002]. Un autre exemple est la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines huiles essentielles, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathione S-transférase chez la souris [Ahmad *et al.*, 1997] et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(a)pyrène au niveau des poumons de la souris [Zheng *et al.*, 1992]. Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain [Lee *et al.*, 2005].

Il existe d'autres composés volatils qui ont montré une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (gliomes, cancer du côlon, du poumon, du foie, du sein, etc.) [Edris, 2007]. Le géraniol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les huiles essentielles, diminue la résistance des cellules cancéreuses du côlon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux. De ce fait, le géraniol potentialise l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du 5-fluorouracil [Carnesecchia *et al.*, 2002; Carnesecchia *et al.*, 2004]. L'huile essentielle de sapin baumier et un de ses composés, l' $\alpha$ -humulène, ont montré une activité anticancéreuse significative sur plusieurs lignées cellulaires ainsi qu'une faible toxicité envers les cellules saines [Legault *et al.*, 2003].

L'activité anticancéreuse du *d*-limonène, le composé principal des huiles essentielles de *Citrus* a été prouvée à plusieurs reprises, en particulier au niveau du cancer de l'estomac et du foie [Uedo *et al.*, 1999]. Un dernier exemple est l' $\alpha$ -bisabolol. L'activité antigliomale de cet alcool sesquiterpénique présent en grande majorité dans l'huile essentielle de camomille (*Matricaria*) a récemment été mise en évidence [Cavalieri *et al.*, 2004]. Puisqu'une grande partie de ce travail de maîtrise repose sur cette molécule, un chapitre entier lui est consacré (chapitre 4).

Pour terminer, certaines études ont mis en évidence l'activité cytotoxique d'huiles essentielles dans leur ensemble. En voici quelques exemples: l'huile essentielle de *Comptonia peregrina* [Sylvestre *et al.*, 2007], *Myrica gale* [Sylvestre *et al.*, 2005], *Melissa officinalis* [De Sousa *et al.*, 2004], *Malaleuca alernifolia* [Calcabrini *et al.*, 2004], *Crotons flavens* [Sylvestre *et al.*, 2005] et *Artemisia annua* [Li *et al.*, 2004].

## CHAPITRE 3

### LES HYDROLATS

#### 3.1. Considérations générales

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles par entraînement à la vapeur, un sous-produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat ou *hydrosol* en anglais. Au cours de la distillation, la vapeur d'eau traverse la matière végétale puis se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant. L'eau se dissocie alors spontanément de l'huile essentielle du fait de leur non miscibilité tout en conservant une petite portion des composés volatils de l'huile essentielle [Price *et al.*, 2004]. Malgré cette faible concentration en principes actifs, les hydrolats présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes qui seront présentées dans ce chapitre.

Certains hydrolats sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires: les hydrolats de rose, de fleur d'oranger, de lavande et de fleurs de bleuets sauvages en sont des exemples. Certaines plantes sont distillées uniquement pour leur hydrolat comme par exemple *Hamamelis virginiana* L. dont le distillat de feuilles et de rameaux floraux est un composant fréquent de produits dermatologiques grâce à ses propriétés désinfectantes et astringentes [Bremness, 1996]. Le principal marché des hydrolats se situe dans le domaine des cosmétiques et des arômes alimentaires. Cependant, avec le regain d'intérêt actuel

pour les médecines alternatives telle que l'aromathérapie, les hydrolats sont aujourd'hui de plus en plus utilisés pour leurs vertus thérapeutiques [Catty, 2001]. Malgré cet engouement, les chercheurs ne s'y intéressent que très peu. Il existe donc un réel manque de données scientifiques dans ce domaine. Pourtant, la faible toxicité et la nature chimique des hydrolats en font un produit original, intéressant à étudier comme en témoignent les rares publications parues à leur sujet. Les études pharmacologiques réalisées présentent en effet des résultats très prometteurs.

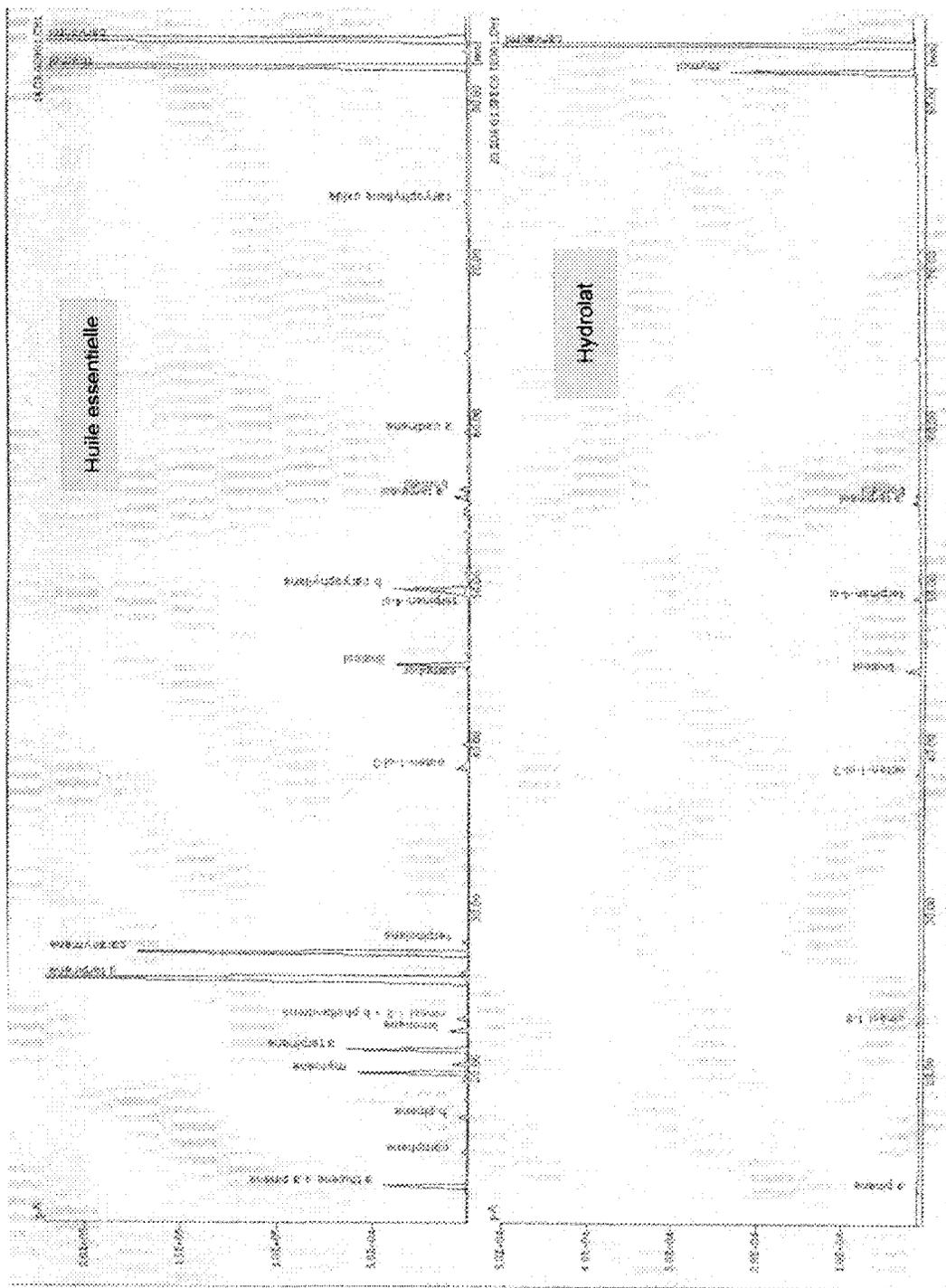
Dans la littérature scientifique anglophone, les hydrolats sont trouvés sous différentes appellations: *hydrosol*, *floral water*, *aqueous distillate*, *aromatic water*, etc. La plupart de ces termes prêtent à confusion puisque beaucoup sont employés d'une manière incorrecte. Le terme *hydrosol* est le plus communément utilisé mais ce mot est inapproprié puisqu'il s'agit d'un terme générique employé pour désigner, en chimie physique, une solution colloïdale dans l'eau. Un *hydrosol* est obtenu par macération prolongée de l'huile essentielle dans de l'eau pure alors que l'hydrolat est obtenu par un procédé d'hydrodistillation. Le terme *floral water* ou eau florale est également inadéquat puisqu'il désigne uniquement les infusions obtenues par macération de fleurs dans l'eau. Pour mettre fin à cette confusion, les anglophones utilisent de plus en plus le terme français « hydrolat » [Price *et al.*, 2004].

### **3.2. Composition**

Les hydrolats contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile. La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles: les molécules oxygénées

hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps quasi absents. Certains hydrolats présentent une plus grande proportion de molécules lipophiles comme ceux de *Mentha piperita* ou *Melissa officinalis* [Price *et al.*, 2005].

Pour pouvoir effectuer l'analyse de la composition chimique des hydrolats par GC-MS, il est nécessaire de « concentrer » l'hydrolat avant l'injection, en procédant à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que le chloroforme. À titre d'exemple, les chromatogrammes suivants (Figure 8) permettent de constater *de visu* les différences entre la composition de l'huile essentielle et celle de l'hydrolat d'*Origanum compactum* [Jeannot *et al.*, 2003]. Au total, 29 composés ont été détectés et identifiés dans l'huile essentielle et seulement huit dans l'hydrolat. Ces huit composés sont également présents dans l'huile essentielle: il n'y a donc pas, dans ce cas, de composés spécifiques à l'hydrolat. Ces molécules appartiennent à la famille des alcools, cétones et phénols. Aucun mono ou sesquiterpène n'a été détecté mise à part quelque traces d' $\alpha$ -pinène. Les deux produits majoritaires sont le thymol et le carvacrol (>95%). Comparativement au carvacrol, le thymol se retrouve en plus faible proportion dans l'hydrolat car celui-ci est moins soluble dans l'eau que le carvacrol.



**Figure 8.** Comparaison de la composition de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* et de l'hydrolat correspondant [Jeannot *et al.*,2003]

### 3.3. Activités biologiques et pharmacologiques

Les hydrolats sont délaissés par la communauté scientifique à l'instar des huiles essentielles qui, elles, sont beaucoup plus étudiées à travers le monde. Les quelques rares publications recensées dans la littérature à leur sujet datent des cinq dernières années ce qui montre un intérêt récent pour les hydrolats. De plus, ces études présentent toutes des résultats très prometteurs concernant le potentiel pharmacologique de ces types d'extrait.

#### 3.3.1. Activité antibactérienne

Des chercheurs de l'Université d'Isparta en Turquie se sont intéressés au potentiel antibactérien d'hydrolats issus d'épices abondamment utilisées en alimentation pour aromatiser les préparations culinaires [Sagdiç *et al.*, 2003]. Plusieurs hydrolats d'épices de Turquie ont été testés tels que ceux de romarin (*Rosmarius officinalis* L.), de basilic (*Ocimum basilicum* L.), d'origan (*Origanum vulgare* L.) ou encore d'anis (*Pimpinella anisum* L.). L'étude a été réalisée sur plusieurs bactéries pathogènes (*Escherchia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis*, *Staphilococcus aureus* ATCC 2392, etc.). Les hydrolats d'origan et de sarriette ont montré une activité bactériostatique très intéressante (Tableau 2). Les hydrolats de thym « noir » (*Thymbra spicata* L.), de cumin (*Cuminum cyminum* L.) puis d'anis (*Pimpinella anisum* L.) ont également montré une activité intéressante contre certaines bactéries. La forte activité bactériostatique des hydrolats de sarriette et d'origan est due à la présence de carvacrol et de thymol, qui comme vu précédemment (chapitre 2), sont deux phénols monoterpéniques connus pour leur activité antibactérienne [Deans *et al.*, 1990; Farag *et al.*, 1989].

**Tableau 2.** Activité antibactérienne d'hydrolats d'épices contre des bactéries pathogènes  
[Sagdiç *et al.*, 2003]

Bactéries	Diamètre de la zone d'inhibition en mm (diamètre disque = 5 mm)				
	Anis	Cumin	Origan	Sarriette	Thym
<i>B. amyloliquwfaciens</i> ATCC 3842	-	-	27	14	12
<i>B. Brevis</i> FMC 3	-	14	15	15	16
<i>B. cereus</i> FMC 19	-	-	14	15	15
<i>B. subtilis var.niger</i> ATCC 10	-	-	20	14	-
<i>E. aerogenes</i> CCM 2531	-	26	14	16	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9	-	16	18	13
<i>E. coli</i> O 157:H7 ATCC 33150	-	19	19	10	-
<i>K. pneumoniae</i> FMC 5	-	-	20	16	-
<i>P. vulgaris</i> FMC 1	-	-	19	16	14
<i>S. enteridis</i>	-	-	15	17	14
<i>S. gallinarum</i>	-	-	14	16	14
<i>S. typhimurium</i>	-	-	20	15	-
<i>S. aureus</i> ATCC 2392	-	-	33	18	-
<i>S. aureus</i> ATCC 28213	12	-	15	16	10
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	-	-	16	17	13

--: Aucune inhibition

Ces résultats ouvrent une perspective intéressante dans le domaine de l'alimentaire, de la cosmétique et de la pharmaceutique dans la mesure où les agents de conservation chimiques pourraient être remplacés par des hydrolats tant que l'impact organoleptique de ceux-ci demeure acceptable. En effet, il a été démontré que des additifs synthétiques convertissent certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogéniques [Frag *et al.*, 1989]. Ce risque pourrait être réduit en utilisant des hydrolats antibactériens, produits naturels issus de plantes aromatiques ne présentant aucun danger pour la santé. Les consommateurs se méfiant de plus en plus des additifs chimiques, la possibilité d'utiliser les hydrolats de thym et d'origan pour la préservation des denrées alimentaires serait fort intéressante [Deans *et al.*, 1989; Sagdiç *et al.*, 2003].

### 3.3.2. Activité antifongique

Les activités antifongiques des hydrolats de cinq épices (romarin, cumin, sarriette, echinophore et basilic) ont été évalués *in vitro* sur des espèces de champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp *tulipae*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*) par des chercheurs de l'Université de Selcuk en Turquie [Boyraz *et al.*, 2005]. L'hydrolat de sarriette (*Satureja hortensis*) a montré l'activité antifongique la plus intéressante sur l'ensemble des champignons testés suivi de l'hydrolat d'échinophore (*Echinophora tenuifolia*) puis de cumin (*Cuminum cyminum*) (Tableau 3).

**Tableau 3.** Activité antifongique d'hydrolats de cinq épices  
(Résultats exprimés en pourcentage d'inhibition)\* [Boyraz *et al.*, 2005]

Champignons	jour	Romarin	Cumin	Sarriette	Basilic	Echinophore
<i>R. solani</i>	3	12,1	62,7	100,0	S	100,0
	4	12,1	45,9	100,0	S	100,0
	5	11,5	35,5	100,0	S	100,0
	6	10,0	28,9	100,0	S	100,0
	7	7,3	19,8	100,0	S	100,0
<i>F. oxyspoum</i>	3	S	32,6	100,0	5,1	55,1
	4	8,2	27,4	75,5	4,1	54,4
	5	6,6	22,6	72,9	4,7	52,8
	6	4,4	22,4	72,6	3,2	52,4
	7	4,1	18,8	72,4	3,2	48,3
<i>B.cinerea</i>	3	32,2	68,5	100,0	26,7	67,4
	4	17,8	54,4	100,0	17,8	56,7
	5	16,1	39,2	100,0	11,6	46,2
	6	10,0	26,4	100,0	10,1	42,0
	7	7,5	11,3	100,0	8,4	38,5
<i>A. citri</i>	3	S	0,0	100,0	16,7	60,9
	4	S	0,0	100,0	14,4	57,4
	5	S	0,0	100,0	13,8	53,3
	6	S	0,0	76,0	11,3	47,7
	7	S	0,0	70,6	9,7	43,8

S : Stimulation de la croissance.

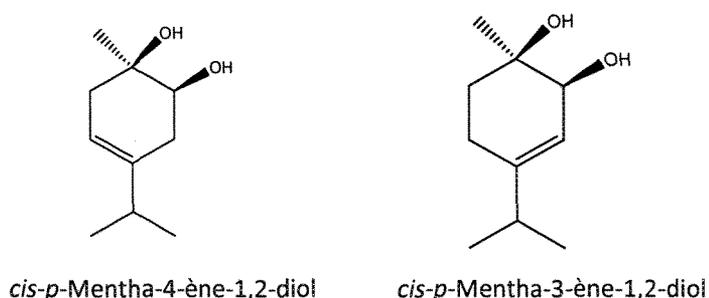
\* Hydrolat dilué à 10%

Dans une seconde étude, ces chercheurs se sont penchés plus précisément sur l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons pathogènes (*Alternaria mali* Roberts et *Botrytis cinerea*) en présence de l'huile essentielle et de l'hydrolat de sarriette [Boyraz *et al.*, 2006]. Étonnamment, l'hydrolat inhibait beaucoup plus fortement la prolifération comparativement à l'huile essentielle. Cela montre bien l'originalité des hydrolats par rapport aux huiles essentielles. Comme précédemment, cette étude suggère que ces hydrolats pourraient être exploités dans certains secteurs comme l'agro-alimentaire ou la cosmétique comme agents antifongiques naturels.

### **3.3.3. Activité pharmacologique**

Le Docteur Suleyman Aydin de la faculté de médecine de l'Université d'Eskisehir en Turquie est l'un des premiers chercheurs à travailler sur l'activité pharmacologique d'un hydrolat. Son étude portant sur l'hydrolat d'origan (*Origanum onites* L.) et son activité sur le système gastro-intestinal est l'une des premières réalisée dans ce domaine [Aydin *et al.*, 2004]. *Origanum onites* L. (origan) est une plante originaire de Sicile, dont l'hydrolat était très employé depuis l'antiquité pour soigner divers maux tels que les problèmes reliés au système gastro-intestinal. Bien qu'utilisée depuis des siècles, l'étude de la composition chimique et des propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat de cette plante n'est que très récente. Dans cette étude, l'effet de l'hydrolat d'*Origanum onites* a été analysé sur des sections isolées de fundus, duodénum et iléum de rat, stimulées par l'acétylcholine, qui induit des contractions. Il a été démontré que l'hydrolat inhibe les contractions avec différentes intensités en fonction de la dose employée. Le carvacrol, composé majoritaire de l'hydrolat, n'a montré aucune activité

inhibitrice de l'acétylcholine. Les auteurs suggèrent donc la présence d'autres principes actifs dans l'hydrolat. Selon eux, les menthanes diols (Figure 9) sont possiblement les composés responsables de l'activité pharmacologique de l'hydrolat d'*Origanum onites* car ceux-ci n'apparaissent pas dans l'huile essentielle qui elle ne présente aucune activité inhibitrice sur l'acétylcholine.



**Figure 9.** Structure chimique des menthanes diols

### 3.4. Conclusion

Traités au départ comme un déchet de la distillation des huiles essentielles, les hydrolats sont aujourd'hui de plus en plus présents sur le marché des produits naturels. Les praticiens en aromathérapie les utilisent souvent en compléments d'une thérapie par les huiles essentielles. Malgré la faible proportion en principes actifs, les hydrolats présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes. Leur popularité auprès des consommateurs est principalement due à leur non toxicité par rapport aux huiles essentielles du fait de leurs faibles teneurs en principe actifs. Ils sont de ce fait beaucoup mieux tolérés que les huiles essentielles ce qui en fait un produit de choix pour les aromathérapeutes. Malgré cet engouement, les chercheurs s'intéressent peu aux hydrolats et à leurs potentiels thérapeutiques et il existe donc un réel manque de données fiables dans ce domaine. Suzanne Catty, aromathérapeute exerçant à

Toronto et pionnière dans le domaine de « l'hydrolathérapie », dresse, dans son livre paru en 2001 « *Hydrosols, The Next Aromatherapy* », une liste d'hydrolats et leurs propriétés thérapeutiques mais la source de ces données n'est pas clairement établie [Catty, 2001]. Il serait donc important de vérifier les propriétés avancées par les aromathérapeutes selon une approche scientifique bien précise de manière à s'assurer du réel pouvoir de ces produits.

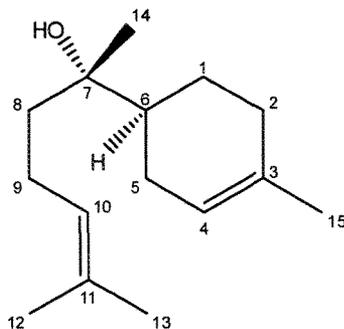
## CHAPITRE 4

### SESQUITERPÈNES ET GLYCOSIDES DE VOLATILS ANTICANCÉREUX: LE CAS DE L' $\alpha$ -BISABOLOL

#### 4.1. L' $\alpha$ -bisabolol

Les sesquiterpènes et leurs dérivés constituent une classe de composés naturels très prometteuse dans la recherche de nouveaux agents anticancéreux. De nombreux sesquiterpènes ont, en effet, démontré un potentiel comme agents thérapeutiques [Modzelewska *et al.*, 2005] dans le traitement du cancer. L' $\alpha$ -humulène [Legault, 2003] et le  $\beta$ -élémane [Wang, 2005] en sont des exemples.

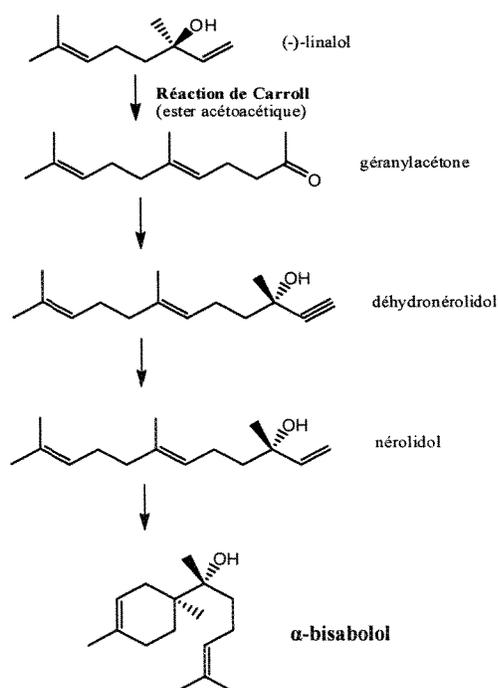
L' $\alpha$ -bisabolol (Figure 10), un alcool sesquiterpénique présent dans un grand nombre d'huiles essentielles dont le stéréoisomère (6S,7S)- $\alpha$ -(-)-bisabolol est le plus commun, se classe également parmi cette catégorie de sesquiterpènes potentiellement actifs contre le cancer. Ce sesquiterpène monocyclique est un composé fréquent des huiles essentielles. Il est, par exemple, le composé majoritaire de l'huile essentielle de camomille (*Matricaria chamomilla*) à plus de 50% [Jakovlev *et al.*, 1969] et de l'huile essentielle de bourgeons de peuplier baumier (*Populus balsamifera*) à plus de 25% (voir chapitre 5).



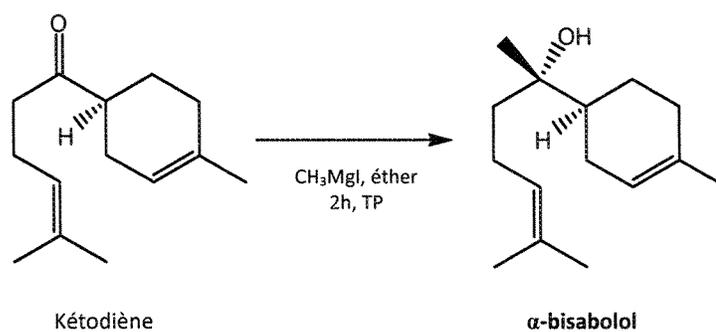
**Figure 10.** Structure chimique du (6S,7S)- $\alpha$ -(-)-bisabolol

L' $\alpha$ -bisabolol est un ingrédient courant des préparations cosmétiques et pharmaceutiques du fait de ses nombreuses qualités. Il est, en effet, très apprécié par ces industries car il est non toxique ( $LD_{50} = 15,1$  mL/kg chez la souris) [Habersang *et al.*, 1979], non irritant [Madhavan, 1999], il dégage une odeur florale agréable [Ohloff, 1994], il possède une activité anti-inflammatoire [Jakovlev *et al.*, 1969; Jakovlev *et al.*, 1979; Thiele *et al.*, 1969] et il améliore la pénétration des composés peu liposolubles (5-fluorouracil, acétonide de triamcinolone) qui passent difficilement au travers de la peau [Kadir *et al.*, 1991].

L' $\alpha$ -bisabolol est facilement disponible à partir de sources naturelles (huile essentielle de camomille par exemple), mais il peut également être commodément synthétisé. Il est obtenu industriellement à partir du linalol via le *trans*-nérolidol (Figure 11) selon la réaction de Carroll [Sell, 2006]. Une autre voie de synthèse à partir de la cétodiène (Figure 12) existe aussi [Forrester *et al.*, 1972].



**Figure 11.** Synthèse de l' $\alpha$ -bisabolol à partir du linalol [Sell, 2006]



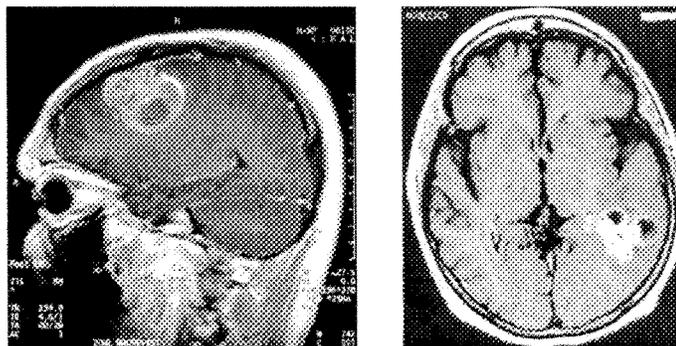
**Figure 12.** Synthèse de l' $\alpha$ -bisabolol à partir du cétodiène [Forrester *et al.*, 1972]

L'activité anticancéreuse de l' $\alpha$ -bisabolol a été découverte en 2004 par une équipe de chercheurs en Italie [Cavalieri *et al.*, 2004]. Ces chercheurs ont mis en évidence l'effet apoptotique de l' $\alpha$ -bisabolol sur des cellules tumorales au niveau du système nerveux central (gliomes). Son

activité cytotoxique est dépendante du temps de traitement ainsi que de la dose utilisée. À une concentration élevée de 10  $\mu\text{M}$ , 100% des cellules cancéreuses meurent. À des concentrations de 2,5 à 3,5  $\mu\text{M}$ , ce taux est réduit de moitié. La carmustine, qui est actuellement en chimiothérapie l'une des drogues les plus efficaces contre les gliomes, est incapable d'obtenir *in vitro* un pourcentage de mortalité cellulaire de 100% à des concentrations correspondant à une dose létale 10 ( $\text{LD}_{10} = 13 \text{ mg/kg}$ ) [Cavalieri *et al.*, 2004].

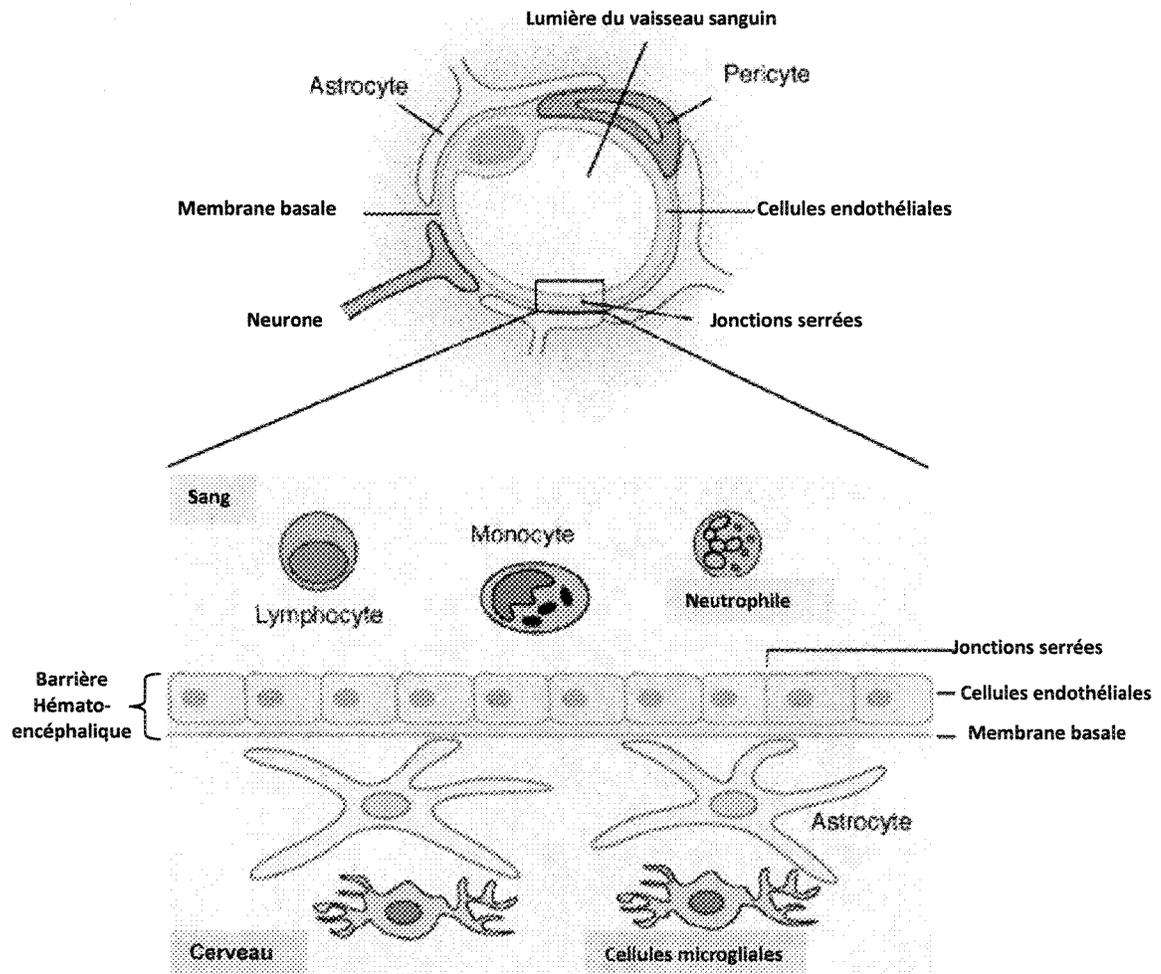
#### 4.2. La barrière hémato-encéphalique

Les tumeurs cancéreuses qui apparaissent au niveau du système nerveux central sont les plus difficiles à enrayer car le cerveau est l'un des éléments du corps humain le mieux protégé. Il existe plusieurs types de cancer du cerveau. Leurs noms sont issus du type de cellules et des régions du cerveau concernées par la tumeur: astrocytome, médulloblastome, oligodendrogliome, glioblastome. Ce dernier est la forme la plus fréquente est la plus maligne (Figure 13) [Stewart *et al.*, 2005].



**Figure 13.** Images de tumeurs cérébrales obtenues par résonance magnétique nucléaire (IRM)

La chimiothérapie est bien souvent peu efficace face à ce type de cancer car il est très difficile de faire passer par voie sanguine les agents thérapeutiques à l'intérieur du cerveau. Il existe en effet une barrière anatomique, appelée barrière hémato-encéphalique (BHE), qui filtre et contrôle de manière drastique le passage des molécules du sang vers le liquide céphalo-rachidien. Cette barrière est située au niveau de l'endothélium vasculaire (Figure 14) [Ge *et al.*, 2005; Newton, 2006]. Le principe de filtrage serait dû aux jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui empêcheraient le passage des molécules entre les cellules et obligerait celles-ci à emprunter les canaux et les pompes disponibles sur la cellule. Le rôle de la BHE est capital car elle empêche toute intrusion dans le cerveau qui pourrait être néfaste. Cependant, cela complique grandement les choses lorsqu'il est nécessaire de faire pénétrer des agents thérapeutiques. Par conséquent, un défi supplémentaire s'ajoute lorsqu'il s'agit de trouver des agents actifs contre les tumeurs cérébrales: en plus d'être anticancéreuses, ces molécules doivent être capables de diffuser au travers de la BHE.



**Figure 14.** Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique [Francis *et al.*, 2003]

La BHE est sélective aux petites molécules lipophiles comme la caféine ou la nicotine. Ces molécules sont capables de diffuser rapidement et de manière passive au travers des cellules endothéliales et de la membrane basale. La lipophilicité est donc un paramètre important de la diffusion au travers de la BHE [Newton, 2006]. Le cas de l'héroïne illustre bien l'importance de ce paramètre puisque cette molécule, qui est un dérivé acétylé de la morphine, diffuse 100 fois plus facilement que la morphine elle-même [Shah, 2003].

Pour améliorer la pénétration des composés au travers de la BHE, il est possible de procéder à des modifications chimiques. Ces modifications doivent améliorer les propriétés physicochimiques de diffusion sans perturber les groupements responsables de l'activité (pharmacophore). Plusieurs études statistiques réalisées à partir d'un grand nombre de drogues neuroactives ont permis de déterminer quels étaient les paramètres physicochimiques qui entrent en jeu dans le processus de diffusion passive ainsi que leur valeurs optimales [Ecker *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2005; Hitchcock *et al.*, 2006]. Les paramètres retenus sont la masse moléculaire (MW), la surface polaire (PSA), le nombre d'hydrogènes donneurs (HBD), le coefficient de partage entre deux phases octanol/eau ( $\log P$ ), et le coefficient de distribution entre deux phases (octanol/eau) à un pH donné ( $\log D$ ). Les valeurs optimales sont consignées dans le tableau suivant :

**Tableau 4.** Valeurs optimales des paramètres physicochimiques relatifs à la diffusion au travers de la BHE [Hitchcock *et al.*, 2006]

Propriétés	Limites suggérées	Valeurs optimales
PSA (Å)	< 90	< 70
HBD	< 3	0-1
clogP	2-5	2-4
clogD (pH 7,4)	2-5	2-4
MW (Da)	< 500	< 450

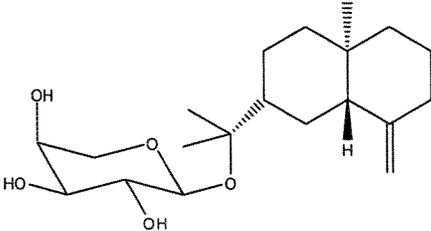
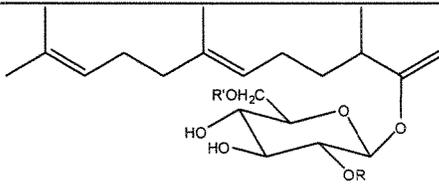
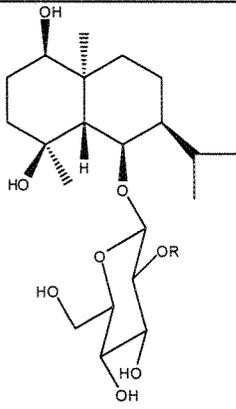
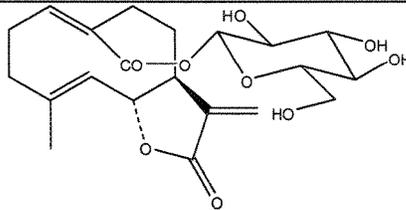
En se basant sur ces valeurs optimales, il est possible d'estimer, par modélisation moléculaire *in silico*, si les modifications chimiques apportées à une molécule amélioreront ou non son aptitude à traverser la BHE. L'une des modifications la plus couramment employée est l'ajout de groupements lipophiles sur la molécule, tels que des groupements méthyles (exemple précédemment cité de l'héroïne). La glycosidation est également une modification envisageable [Newton, 2006] bien que cela puisse paraître étonnant. En effet, l'ajout d'une section sucre sur

une molécule ne devrait pas favoriser sa perméabilité membranaire puisque cela réduirait sa lipophilicité [Křen *et al.*, 2001]. Pourtant, à plusieurs reprises, la glycosidation a permis d'améliorer l'action pharmacologique de certains composés qui entraient difficilement à l'intérieur du cerveau. C'est le cas par exemple de l'opioïde, un neuropeptide ayant une activité analgésique [Egleton *et al.*, 2001]. La glycosidation de cette molécule a permis d'améliorer son action analgésique en augmentant sa biodisponibilité au niveau du cerveau. L'amélioration de cette dernière est en relation avec la prolongation de la durée de demi-vie dans le plasma (temps nécessaire pour que sa concentration plasmatique diminue de 50%) et l'amélioration de la diffusion au travers de la BHE [Egleton *et al.*, 2001]. Ainsi, l'intérêt principal de la glycosidation est d'accroître la biodisponibilité d'une molécule en améliorant sa solubilité dans les liquides biologiques. Une plus grande concentration de la molécule peut alors se rendre jusque dans les vaisseaux au niveau de la BHE et tant que les critères physico-chimiques relatifs à la diffusion passive au travers de la BHE sont respectés (Tableau 4), la molécule est susceptible de diffuser et de pénétrer à l'intérieur du cerveau. Aussi, certains glycosides peuvent être transportés activement dans le cerveau en empruntant le système de transport de glucose [Křen *et al.*, 2001].

#### **4.3. Les composés volatils glycosidés**

À l'intérieur du tissu végétal, les composés volatils des plantes peuvent être présents sous une forme glycosidée (« *glycosidically bound volatiles* »), c'est-à-dire liés à un sucre. Ces molécules, parfois appelées précurseurs d'arômes, font l'objet de plusieurs études en particulier dans l'industrie du vin et du tabac. La partie aglycone de ces composés consiste en des structures diverses: monoterpènes, sesquiterpènes, alcools aliphatiques, alkylphénols, etc. La section

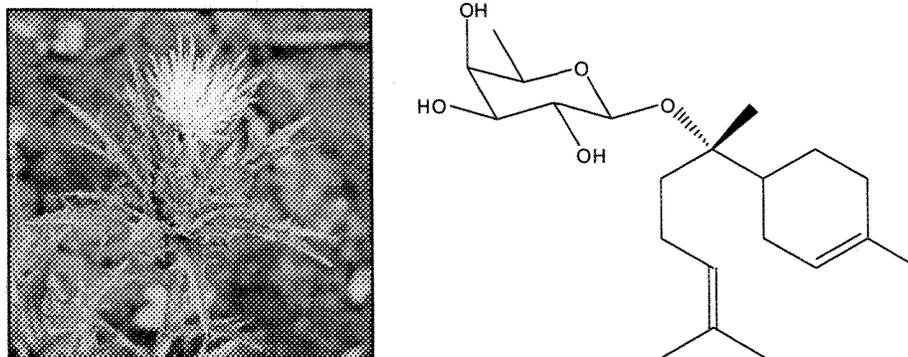
osidique est généralement un saccharide ou un disaccharide. Le glucose est le sucre le plus souvent rencontré chez ces glycosides naturels [Vasserot *et al.*, 1995; Mastelić *et al.*, 2004]. À l'aide d'une hydrolyse enzymatique ou chimique, les composés volatils sont libérés de leur section sucre. Le rôle physiologique de ces composés est encore mal défini: interviennent-ils dans le transport des molécules peu hydrosolubles au travers des tissus de la plante, dans la biosynthèse des huiles essentielles ou dans le mécanisme de protection des membranes cellulaires contre les composés toxiques comme les phénols? La question reste en suspend [Stahl-Biskup *et al.*, 1993]. Il est cependant connu que ces composés sont impliqués dans le processus de formation des parfums des plantes, de l'arôme des vins ou des thés et dans la libération des composés aromatiques des fruits et épices [Mastelić *et al.*, 2004]. Les sesquiterpènes sont fréquemment retrouvés sous la forme glycosidée et un grand nombre de ces composés ont à ce jour été identifiés dans diverses plantes (Figure 15).

Sesquiterpènes glycosidés	Structures	Références
<p><b>(+)-<math>\beta</math>-Eudesmol O-<math>\alpha</math>-L-arabinopyranoside</b></p> <p>(type eudesmane)</p>		Yoshioka <i>et al.</i> , 1969
<p><b>Loquatifolin A</b></p> <p>R= <math>\alpha</math>-L-Rha(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-L-Rha(1<math>\rightarrow</math>2)</p> <p>R'=<math>\alpha</math>-L-Rha(1<math>\rightarrow</math>6)</p> <p>(<i>trans</i>-nérolidol)</p>		Yanagisawa <i>et al.</i> , 1988
<p><b>Pterodontriol 6-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside</b></p> <p>(type eudesmane)</p>		Hua <i>et al.</i> , 2004
<p><b>Taraxinsäure-1'-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside</b></p> <p>(type germacrane)</p>		Miyase <i>et al.</i> , 1991

**Figure 15.** Exemples de sesquiterpènes glycosidés naturels

En ce qui concerne l' $\alpha$ -bisabolol, un glycoside de cette molécule a été isolé en 1982 à partir d'une plante méditerranéenne, *Carthamus lanatus* ou carthame laineux [San Feliciano *et al.*, 1982]. Il s'agit de l' $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (Figure 16). Ce composé a montré une activité

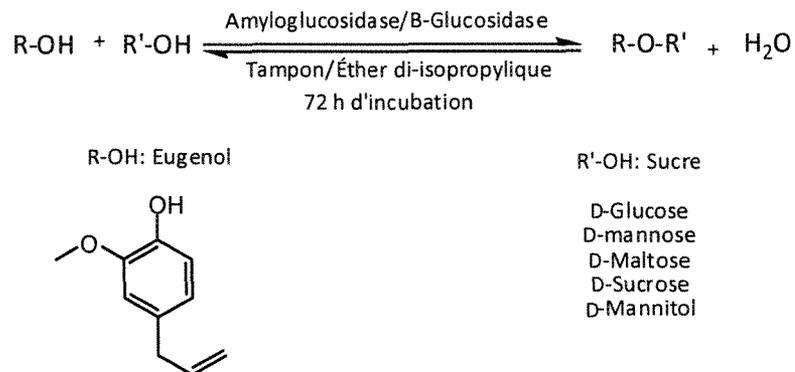
cytotoxique (test sur crevettes: *Artemisia salina*) et antibactérienne intéressante [Mikhova *et al.*, 2004]. L' $\alpha$ -bisabolol-6-désoxy- $\beta$ -altropyranoside a également été identifié dans une autre espèce de *Carthamus*, la *C. turkistanikus* [Rustaiyan *et al.*, 1981].



**Figure 16.** *Carthamus lanatus* et l' $\alpha$ -bisabolol- $\beta$ -D-fucopyranoside

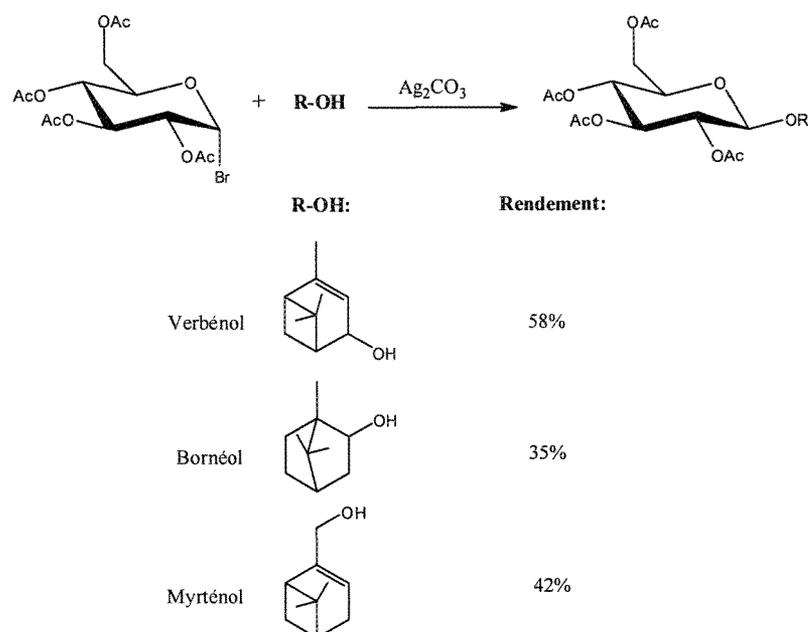
#### 4.4. Synthèse des glycosides de volatils

La plupart des glycosides de composés volatils tels que le fucopyranoside d' $\alpha$ -bisabolol ont uniquement été obtenus par isolement à partir d'extraits de plantes mais jamais par voie de synthèse. D'ailleurs, dans la littérature scientifique, très peu d'études sont consacrées à la synthèse de dérivés glycosidés de composés volatils. Les quelques études traitant ce sujet font intervenir un processus enzymatique (Figure 17) ou une biotransformation [Vijayakumar *et al.*, 2007; Orihara *et al.*, 1992]. Ces méthodes ne donnent généralement que de faibles rendements (7-52%).



**Figure 17.** Synth\u00e8se de glycosides de volatils utilisant un processus enzymatique [Giriyapura *et al.*, 2007].

La synth\u00e8se organique est parfois employ\u00e9e. La m\u00e9thode la plus souvent utilis\u00e9e est celle de Koenigs-Knorr (Figure 18). Cependant, les rendements obtenus avec cette proc\u00e9dure sont bien souvent mod\u00e9r\u00e9s [Masteli\u0107 *et al.*, 2004; Patov *et al.*, 2006].



**Figure 18.** Synth\u00e8se de d\u00e9riv\u00e9s glycosid\u00e9s de monoterp\u00e9nols selon la m\u00e9thode de Koenigs-Knorr [Patov *et al.*, 2006]

Une alternative à cette méthode est celle de Schmidt, utilisant les trichloroacétimidates [Schmidt *et al.*, 1994]. Cette voie de synthèse, qui n'a jamais été utilisée pour la synthèse de glycosides de molécules volatiles, permet généralement d'améliorer grandement les rendements.

Concernant la nature des composés glycosidés, seuls quelques dérivés de monoterpènes (bornéol, thymol, carvacrol) et phénylpropanes (eugénol, 2-pényléthanol) ont, à ce jour, été synthétisés mais très peu de dérivés de sesquiterpènes [Mbaïraroua *et al.*, 1994; Mastelić *et al.*, 2004; Patov *et al.*, 2006].

#### **4.5. Potentiel pharmacologique des glycosides de volatils**

Les sesquiterpènes comme l' $\alpha$ -bisabolol sont généralement des composés lipophiles donc peu solubles dans l'eau. Cette propriété a pour inconvénient de limiter leurs possibles applications pharmacologiques car ils sont de ce fait peu solubles dans les fluides biologiques. Cependant, en leur greffant une section sucre, leur hydrophilicité est sensiblement améliorée. De plus, cette modification peut influencer les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques de ces composés [Krěn, 2001]. La synthèse de dérivés glycosidés de sesquiterpènes est donc un moyen intéressant de produire de nouveaux agents thérapeutiques d'autant plus que cette pratique n'a été, à ce jour, que très peu explorée. De ce fait, au cours de ce projet de maîtrise, nous nous sommes intéressés à la synthèse de dérivés glycosidés de l' $\alpha$ -bisabolol. L'effet de l'ajout d'une section sucre sur son activité anticancéreuse a également été étudié. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 6 sous la forme d'un article scientifique.

**CHAPITRE 5****ARTICLE SCIENTIFIQUE:**

**“CHEMICAL COMPOSITION AND ANTICANCER ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL  
FROM *POPULUS BALSAMIFERA* BUDS”**

## Résumé

Le peuplier baumier (*Populus balsamifera* L. Salicaceae) est une espèce commune des forêts du Canada et du nord des États-Unis. Cet arbre se caractérise principalement par ses bourgeons gommeux très odorants. L'huile essentielle produite par ces bourgeons à différents moments de l'année (printemps et automne) ainsi que celle issue des très jeunes feuilles a été extraite par entraînement à la vapeur. La composition chimique de ces huiles essentielles a été analysée par chromatographie gazeuse GC-FID et GC-MS. Au total, 50 composés ont été identifiés. Les huiles essentielles de printemps, automne et de jeunes feuilles ne montrent pas de différences marquantes dans leur composition. L' $\alpha$ -bisabolol (31,4%—38,7%) a été identifié comme étant le composé majoritaire dans chaque huile essentielle suivi par le  $\delta$ -cadinène (6,0%—5,7%) et le *trans*-nérolidol (5,6%—4,2%). Une analyse quantitative de la concentration du composé majoritaire dans chaque huile essentielle a été effectuée et les résultats ont montré que l' $\alpha$ -bisabolol est nettement présent en plus grande quantité dans l'huile essentielle de bourgeons d'automne (334 mg/mL contre 190 mg/mL). L'évaluation de l'activité anticancéreuse de ces huiles a été effectuée vis-à-vis deux lignées tumorales, A549 (carcinome de poumon) et DLD-1 (adénocarcinome de côlon). Les huiles essentielles de printemps et de jeunes feuilles ont exercé une activité cytotoxique semblable vis-à-vis des deux lignées ( $IC_{50}$  35 et 37  $\mu$ g/mL) alors que l'huile essentielle d'automne s'est montrée moins active ( $IC_{50}$  47 et 50  $\mu$ g/mL). L'activité cytotoxique de l'huile essentielle de *Populus balsamifera* peut être due en partie la présence des deux sesquiterpènes majoritaires, le *trans*-nérolidol ( $IC_{50}$  6.4 et 5.8  $\mu$ g/mL) et l' $\alpha$ -bisabolol ( $IC_{50}$  18 et 26  $\mu$ g/mL).

## **Chemical Composition and Anticancer Activity of Essential Oil**

### **From *Populus balsamifera* buds**

Marianne Piochon, Jean Legault and André Pichette\*

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

\* Corresponding author. Tel: +1 418 545-5011; fax: +1 418 545-5012; e-mail: andre\_pichette@uqac.ca

**Abstract**

The chemical composition of *Populus balsamifera* essential oils obtained from spring buds, fall buds, and young leaves were determined by GC and GC-MS analyses.  $\alpha$ -Bisabolol (**1**), a known nontoxic sesquiterpene, was found to be the major constituent (31.4-38.7%). The anticancer activities of balsam poplar oils were assessed *in vitro* against human lung (A549) and colon (DLD-1) tumor cell lines. Essential oils were found to be moderately active against both cancer cell lines ( $IC_{50}$  35-50  $\mu\text{g/mL}$ ). Two sesquiterpenes present in the oil, *trans*-nerolidol and  $\alpha$ -bisabolol have been found to be cytotoxic against both tumor cell lines.

**Keyword Index:** *Populus balsamifera*, Salicaceae, essential oil, anticancer activity

## 1. Introduction

*Populus balsamifera* L. (Salicaceae), also known as balsam poplar, is a common species of the boreal and mixedwood forests of Canada and northern USA (Marie-Victorin, 1995). Its name comes from the strong balsam smell of its buds in the spring. This particular odor is produced by a sticky resin on the buds called “balm of Gilead” (Marles *et al.*, 2000). The volatile compounds of balsam poplar buds are a complex mixture of mono- and sesquiterpenoids (Isidorov and Vinogorova, 2003) with  $\alpha$ -bisabolol (**1**) (Figure 1) as the major component (Šorm, 1952; Mattes *et al.*, 1987; Saeva and Podol’Skaya, 1997). To the best of our knowledge, a detailed analysis of the chemical composition of the essential oil of balsam poplar buds has not been reported until now.

For the past few years, our research group has been interested in the biopharmaceutical potential of extracts from plants and trees present in the boreal forest such as essential oils (Legault *et al.*, 2003; Sylvestre *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2007). We focused our attention on balsam poplar because the resin obtained from the buds was used by several native North American Indian tribes to treat a variety of diseases (Moerman, 1998). Moreover, to the best of our knowledge, there is no study regarding the biopharmaceutical potential of this essential oil. We consequently screened for the biological activities of the essential oil against different targets and its anticancer activity drew our attention.

In this work, we report the detailed chemical composition of balsam poplar buds essential oil collected in the spring and fall. Essential oil from very sticky young leaves was also analysed. The quantity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) contained in each essential oil was measured using a calibration curve. We also reported the anticancer activity of balsam poplar buds essential oils and its main constituents against human lung carcinoma cell line (A549) and human colon adenocarcinoma cell line (DLD1).

## **2. Results and discussion**

### *2.1. Chemical composition of balsam poplar essential oils*

In this study, essential oils from balsam poplar spring buds (**S**) and fall buds (**F**) were studied. We also collected the very sticky young leaves (**YL**) in the spring. Concerning spring buds, a kinetic study of the hydrodistillation was also performed in order to determine the influence of the time factor on the oil composition. Thus, during this hydrodistillation, fractions were collected at 60 (**F1**), 120 (**F2**), 180 (**F3**) and 240 (**F4**) min. Table 1 presents the composition of these four samples as well as the composition of the three essential oils (**S**, **F**, **YL**). We also reported the yields of extraction calculated on a dry weight basis (w/w) and the refractive index of each essential oil.

All the essential oils and fractions obtained were colorless except **F4** which had a dark yellow color. The yields of extraction obtained for **S** and **YL** were nearly the same (3.5%

and 3.7%, respectively) whereas the one obtained for **F** was much higher (6.7%). According to the yields obtained for each fraction (1.8% for **F1**, 0.7% for **F2**, 0.4% for **F3** and 1.3% for **F4**), it clearly appears that the oil yield was more important during the first and the fourth hour. This suggests that it is important to perform the hydrodistillation of balsam poplar buds for four hours in order to extract the highest yield of the volatile compounds.

Fifty compounds were identified using two chromatographic stationary phases. With increasing time of distillation, the total percentage of sesquiterpenes in each essential oil remained stable around 98.5%. However, as hydrodistillation proceeded, a higher amount of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was noted: 18.2% for **F1**, 44.6% for **F2**, 50.2% for **F3** and 67.7% for **F4**. These results were confirmed by measurement of the amount of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) using a calibration curve (Figure 2). Indeed, the quantity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was higher in the fourth fraction ( $935 \pm 40$  mg) than the others ( $444 \pm 40$  mg for **F1**,  $325 \pm 20$  mg for **F2** and  $276 \pm 10$  mg for **F3**). The amount of monoterpenes decreased in the second hour of hydrodistillation and afterwards remained constant but very low (1.4% to 0.6%). For example, the percentage of *trans*- $\alpha$ -bergamotene, *trans*- $\beta$ -farnesene and  $\delta$ -cadinene decreased with time from 5.0% to 0.7%, 6.6% to 1.2% and 10.0% to 2.2%, respectively. On the other hand, the amount of sesquiterpenes like  $\tau$ -cadinol,  $\alpha$ -cadinol and  $\beta$ -bisabolol increased from 0.7% to 2.2%, 0.5% to 1.8% and 0.5% to 1.8%, respectively. The amount of *trans*-nerolidol, which was the second major constituent, increased particularly during the second hour of the process (4.0% to 6.4%).

The chemical composition of the essential oils from spring buds (S), fall buds (F) and young leaves (YL) did not show any major differences. The three balsam poplar essential oils were mostly composed of sesquiterpenes (around 98.5%) and the amount of monoterpenes was small (0.9 % for S and 0.2% for YL). In agreement with the literature (Šorm *et al.*, 1952; Mattes *et al.*, 1987),  $\alpha$ -bisabolol (1) was by far the major constituent (31.4-38.7%). According to measurements with the calibration curve, the concentration of  $\alpha$ -bisabolol (1) was much more important in F (334 mg/mL) than in S and YL essential oils (190 mg/mL both). These results suggest that it is more profitable to use fall buds to extract  $\alpha$ -bisabolol (1) especially as the yield of extraction was also higher than with spring buds. Hence, this study shows that balsam poplar fall buds may represent an interesting natural source of  $\alpha$ -bisabolol (1).

## 2.2. Cytotoxic activity of balsam poplar essential oils

The cytotoxicities of S, YL, F, the four fractions (F1, F2, F3, F4) and  $\alpha$ -bisabolol (1) the major constituent were assessed *in vitro* against human lung carcinoma (A549) and colon adenocarcinoma (DLD-1) cell lines. Inhibition of growth cells was assessed by DNA quantification using Hoechst assay (Rago *et al.*, 1990). Assessments were also carried out on normal human skin fibroblasts (WS1). Cell lines were submitted to growing concentration of each balsam poplar essential oil and  $\alpha$ -bisabolol (1) for 48 h. Results are

presented in Figure 3 and discussed therein. They are expressed as the concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) inhibiting 50% of the cell growth ( $\text{IC}_{50}$ ).

The balsam poplar essential oils **S** and **YL** did not display major differences in their ability to inhibit growth tumor cells ( $\text{IC}_{50}$  35-37 and 36-37  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) whereas **F** exhibited lower activity ( $\text{IC}_{50}$  47-50  $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.05$ ). It is worth noting that all essential oils were equally active against both tumor cell lines ( $P > 0.05$ ). Regarding the cytotoxicity of fractions **F1** to **F4**, it appears that **F2**, **F3** and **F4** ( $\text{IC}_{50}$  26-28, 23-24 and 26  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) were significantly ( $P < 0.05$ ) more active than **F1** ( $\text{IC}_{50}$  41-44  $\mu\text{g/mL}$ ) which was the fraction with the lowest  $\alpha$ -bisabolol (**1**) content (18.6%). Hence, the main constituent  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was also evaluated for its cytotoxic potential and marked activity was observed ( $\text{IC}_{50}$  18-26  $\mu\text{g/mL}$ ). However, activity of the balsam poplar essential oils can not be exclusively due to the cytotoxicity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**). Indeed, others compounds of the essential oils such as *trans*-nerolidol (4.0-5.6%) and  $\alpha$ -humulene (0.2-0.7%) have already been reported by our laboratory for their strong anticancer activity against A549 and DLD-1 ( $\text{IC}_{50}$  5.8-6.4 and 6.1-14.9  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) (Sylvestre *et al.*, 2007). The cytotoxicity of the essential oils could be explained by the possible synergistic effects between these active compounds and certain other constituents of the essential oil. To the best of our knowledge,  $\alpha$ -bisabolol (**1**) has never before been shown in the literature to inhibit the proliferation of A549 and DLD-1 cancer cell lines. A recent study demonstrated its cytotoxic apoptosis-inducing effect (Darra *et al.*, 2008) against human and rat glioma cells (Cavalieri *et al.*, 2005; Modzelewska *et al.*, 2005).

### **3. Conclusions**

In this study, the detailed chemical composition of balsam poplar young leaves, and spring and fall buds essential oils were established. Kinetic studies of the hydrodistillation determined the influence of the time factor on spring buds essential oil composition. Moreover, the cytotoxic activities of these oils were assessed against lung and colon cancer cell lines and were found to be active. The two major components  $\alpha$ -bisabolol (**1**) and *trans*-nerolidol was found to be partly responsible for the cytotoxic effect of the oil. Quantitative analyses were performed and shown that fall buds essential oil are richer in  $\alpha$ -bisabolol (**1**) than the others.

### **4. Experimental**

#### *4.1. Collection of plant material*

Balsam poplar leaf buds were collected in April 2006 from trees growing wild in the boreal forest in the Saguenay region of Québec, Canada. Young leaves were collected one month later in the same region. Fall buds were collected at the end of September 2006. A specimen was authenticated by Patrick Nadeau (Department of Fundamental Sciences, University of Quebec at Chicoutimi) and a voucher specimen (N<sup>o</sup> 499678) has been deposited at the Herbarium Louis-Marie of Laval University, Québec, Canada.

#### *4.2. Extraction of essential oils*

Essential oils were obtained from freshly harvested buds and young leaves (245 g for spring buds, 120 g for young leaves and 66 g for fall buds) by hydrodistillation for four hours. A second extraction of spring buds was carried out (200 g) and the essential oil was collected every hour to study the kinetic aspect of the extraction. Thus, during the hydrodistillation, fractions were collected at 60, 120, 180 and 240 min. All the essential oils were dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and stored at 4 °C.

#### *4.3. Analysis conditions*

The essential oils were analysed by GC on a gas chromatograph Agilent 6890N (FID detector) equipped with a polar Supelcowax 10 column and an apolar DB-5 column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) and a split-splitless injection port (split mode). The temperature program was 40 °C for 2 min, then 2 °C/min to 210 °C and held constant for 13 min. The compounds were identified by their retention indices on both columns and by GC-MS using a Hewlett-Packard mass spectrometer 5972 at 70 eV coupled to an HP 5890 equipped with a DB-5 column (same as above). Identification of volatile constituents was made on the basis of their retention indices (Kovats, 1965) and their mass spectra, which were compared with reference data (Adams, 2007).

#### *4.4. Quantitative analysis*

A quantitative determination of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) contained in each essential oil was performed by GC-FID. A solution of *n*-tetradecane (5 g/L) was used as the internal standard.  $\alpha$ -(-)-Bisabolol (**1**) with a purity of  $\geq 95\%$  was supplied by Fluka. A series of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) standard solutions in hexanes (eight samples each at 10.69, 5.34, 2.67, 1.34, 0.67, 0.33, 0.17 and 0.08 mM, respectively) were prepared. A calibration curve (Figure 2) was established for the series of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) standards as the function of  $\alpha$ -bisabolol's content and the ratio  $R_{\text{bisabolol}}$  (Ratio =  $\alpha$ -bisabolol's peak area / *n*-tetradecane's peak area). The empirical equation of the calibration curve for  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was  $R_{\text{bisabolol}} = (4.53 \pm 0.02) \times [\text{bisabolol}] + (0.2 \pm 0.1)$ , and the  $R^2$  multiple correlation was 0.9995.

#### 4.5. Cell lines and culture conditions

Human cells lines (A549, DLD-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA) to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone) and vitamins (1 $\times$ ) (Mediatech Cellgro, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.6. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at the density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 100  $\mu\text{L}$  of culture medium and were allowed to

adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each essential oil in ethanol (Sigma-Aldrich) were then added (100  $\mu$ L per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of ethanol in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed with cellular DNA assay using Hoechst dye 33342 (Rago *et al.*, 1990). Cell lysis was performed by adding a solution of SDS (0.01%) at -80 °C before the Hoechst assay was carried out. Measurements were performed on an automated 96-well fluoroskan Ascent F1<sup>TM</sup> plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 365 and 460 nm. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Etoposide was used as positive control. Each experiment was carried out twice in triplicate. IC<sub>50</sub> results were expressed as means  $\pm$  standard deviation.

#### *4.7. Statistical analysis*

Data were subjected to analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Student-Newman Keuls post-hoc test and were considered significantly different when  $P < 0.05$ . All computations were done using statistical software Sigma-Stat version 3.5.

#### **Acknowledgments**

The authors thank H el ene Gagnon, Francois-Xavier Garneau for help and suggestions.

## **References**

Adams, R.P., 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.

Boyd, M. R., 1997. *Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. Anticancer Drug Development Guide*. Teicher, B. A., Ed.; Humana Press. Totowa, NJ, pp. 23-42.

Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., Carcereri de Prati, A., Gottado, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, H., 2004.  *$\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic compound, strongly induces apoptosis in glioma cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 589-594.

Darra, E., Abdel-Azeim, S., Manara, A., Shoji, K., Maréchal, J.-D., Mariotto, S., Cavalieri, E., Perbellini, L., Pizza, C., Perahia, D., Crimi, M., Suzuki, H., 2008. *Insight into the apoptosis-inducing action of  $\alpha$ -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and bid*. *Arch. Biochem. Biophys.* doi:10.1016/j.abb.2008.02.004.

Isidorov, V.A., Vinogorova, V.T., 2003. *GC-MS Analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra**. *Z. Naturforsch.* 58c, 355-360.

Kovats, E., 1965. *Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system*. Adv. Chromatogr. 1, pp 229-247.

Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J.C., 2003. *Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action*. Planta Med. 69, 402-407.

Marie-Victorin, F. 1995. *Flore Laurentienne*. 3<sup>rd</sup> ed. Les Presses de l'Université de Montréal, Québec, Canada.

Marles, R.J., Clavelle, C., Monteleone, L., Tays, N., Burns, D., 2000. *Aboriginal Plant Used in Canada's Northwest Boreal Forest*. UBC press, Vancouver, Canada.

Mattes, B.R., Clausen, T.P., Reichardt, P.B., 1987. *Volatile constituents of balsam poplar: The phenol glycoside connection*. Phytochemistry 26, 1361-1366.

Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, S.K., Khan, S.R., 2005. *Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth*. Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents 5, 477-499.

Moerman, D., 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press. Portland, Oregon, USA.

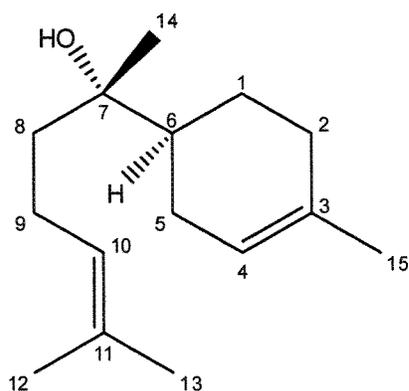
Rago, R., Mitchen, J., Wilding, G., 1990. *DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33 258 after cell lysis by freezing in distilled water*. Anal. Biochem. 191, 31-34.

Saeva, E.V., Podol'skaya, T.M., 1997. *Essential oils of Populus balsamifera*. Lesnoi Zhurnal 4, 58-62.

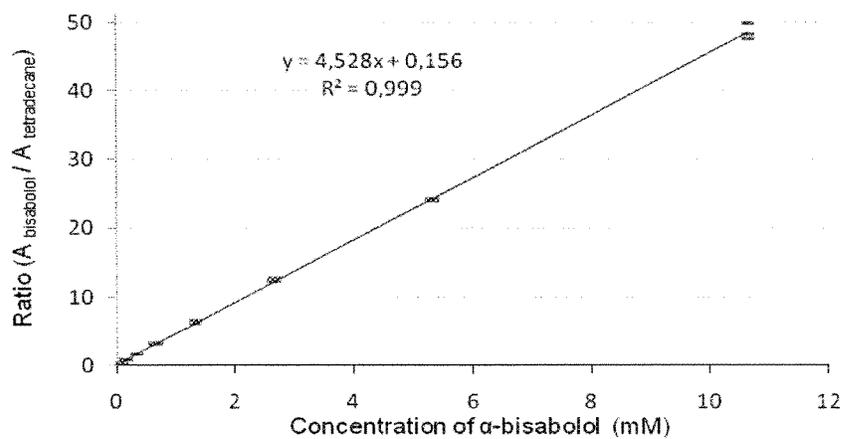
Šorm, F., Vrány, M., Herout, V. 1952. *Složeni silice topolu balsámového (Populus balsamifera L.)*. Chem Listy 46, 364-367.

Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette, A., 2005. *Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of Myrica gale L.* Phytomedicine 12, 299-304.

Sylvestre, M., Pichette, A., Lavoie, S., Longtin, A., Legault, J., 2007. *Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of Comptonia peregrina (L.)*. Phytother. Res. 6, 536-540.



**Figure 1.** Chemical structure of  $\alpha$ -(-)-bisabolol (1)



**Figure 2.** Calibration curve (GC-FID) of  $\alpha$ -bisabolol (1).

**Table 1.** Chemical composition of *Populus balsamifera* essential oils from spring buds (S), fall buds (F), young leaves (YL) and fractions (F1-F4)

Components	RI DB-5 <sup>a</sup>	RI Spwax <sup>b</sup>	<i>Populus balsamifera</i> essential oils						
			S	F1	F2	F3	F4	YL	F
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>									
$\alpha$ -pinene	940	1021	0.1	0.1	–	–	–	–	–
limonene	1032	1194	0.2	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.1
<b>Oxygenated monoterpenes</b>									
1,8-cineole	1033	1200	0.6	0.9	0.3	0.1	–	0.1	–
$\alpha$ -terpineol	1188	1697	0.1	0.2	0.1	0.1	–	–	–
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>									
$\alpha$ -ylangene	1372	1479	0.7	1.0	0.3	0.2	–	0.8	1.2
$\alpha$ -copaene	1376	1488	0.6	0.9	0.3	0.2	–	0.5	0.3
$\alpha$ -cedrene	1406	1554	0.7	0.9	0.4	0.3	–	0.4	0.4
<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamotene	1413	1563	0.3	0.4	0.1	0.1	–	0.1	0.2
$\beta$ -caryophyllene	1413	1581	0.4	0.6	0.2	0.1	–	0.3	0.3
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotene	1437	1578	3.5	5.1	1.7	1.1	0.7	1.9	2.0
guaiaadiene-6,9	1443	1598	0.3	0.4	0.2	0.1	–	0.3	0.4
<i>cis</i> - $\beta$ -farnesene	1446	1625	0.4	0.4	0.2	0.2	–	0.1	0.1
$\alpha$ -humulene	1453	1655	0.5	0.7	0.3	0.2	–	0.5	0.5
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesene	1462	1670	4.7	6.6	2.7	1.8	1.2	2.9	2.6
<i>trans</i> -cadinane-1(6),4-diene	1475	1649	0.9	1.3	0.5	0.3	–	0.6	0.5
$\gamma$ -muurolene	1479	1687	1.2	1.7	0.7	0.5	–	1.2	1.2
$\gamma$ -curcumene	1483	1688	4.1	5.2	1.6	1.7	1.2	0.2	1.2
$\alpha$ -amorphene	1483	1680	2.8	3.0	2.5	1.3	1.2	4.4	4.8
$\alpha$ -curcumene	1486	1768	1.5	1.1	1.0	0.6	–	1.1	1.5
$\delta$ -selinene	1492	–	0.1	0.4	–	–	–	–	0.1
$\gamma$ -amorphene	1497	1718	1.6	2.1	1.0	0.7	–	1.6	1.7
$\alpha$ -selinene	1497	1709	0.3	1.0	0.2	0.1	–	0.4	0.6
epizonarene	1502	1705	2.4	3.0	1.6	1.1	1.1	1.8	1.6
$\alpha$ -muurolene	1503	1725	1.1	1.4	0.7	0.5	–	–	0.4
$\beta$ -guaiene	1505	1666	0.5	0.8	0.6	0.5	–	–	0.4
$\delta$ -amorphene	1510	1718	2.5	1.7	1.8	1.3	0.8	3.0	5.5
$\beta$ -bisabolene	1513	1725	0.9	–	0.9	1.0	1.0	0.4	0.4
$\beta$ -curcumene	1516	1738	3.5	4.5	2.3	1.8	1.4	1.9	2.1
$\gamma$ -cadinene	1516	1749	4.0	4.3	3.8	2.7	–	1.5	1.7
$\beta$ -sesquiphellandrene	1516	1725	0.3	0.6	–	–	–	0.6	–
$\delta$ -cadinene	1526	1749	5.7	10.0	5.2	3.4	2.2	6.0	2.3
zonarene	1533	1749	0.9	1.8	1.2	1.0	0.8	1.0	1.9
<i>trans</i> -cadinane-1,4-diene	1535	1778	0.6	0.6	0.4	0.4	–	0.4	2.1
$\alpha$ -cadinene	1538	1788	0.9	1.1	0.7	0.6	0.5	0.9	1.2

selina-3,7(11)-diene	1541	1758	0.4	0.5	0.9	0.3	0.5	0.6	1.8
$\alpha$ -calacorene*	1541	1913	0.2	0.1	0.2	0.2	–	0.3	0.4
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>									
<i>trans</i> -nerolidol	1564	2044	5.0	4.0	6.4	5.4	4.5	5.6	4.2
fokienol*	1594	–	0.6	0.4	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
guaial*	1604	–	0.2	0.1	0.2	0.2	–	0.3	0.3
1,10-di-epi-cubenol	1624	2132	0.7	0.6	0.9	0.7	0.6	2.1	2.1
$\tau$ -muurolol	1636	2170	0.5	0.4	0.7	0.7	0.6	0.8	0.7
$\tau$ -cadinol	1636	2158	1.2	0.7	1.6	1.8	2.3	1.4	0.4
$\alpha$ -bisabolol oxide B*	1648	2119	0.2	0.1	0.3	0.3	–	0.8	0.6
$\alpha$ -muurolol	1651	2185	0.3	0.2	0.4	0.5	0.7	0.5	0.6
$\alpha$ -cadinol	1651	2214	0.7	0.6	0.9	1.2	1.8	1.2	0.5
$\beta$ -bisabolol oxide B*	1661	2110	0.1	0.1	–	0.2	–	0.3	0.3
$\beta$ -bisabolol	1672	2146	0.9	0.6	1.3	1.5	1.8	1.0	0.9
epi- $\beta$ -bisabolol	1672	2156	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0
<b><math>\alpha</math>-bisabolol (1)</b>	<b>1685</b>	<b>2206</b>	<b>31.4</b>	<b>18.2</b>	<b>44.6</b>	<b>50.2</b>	<b>67.7</b>	<b>38.7</b>	<b>6</b>
<b>Others</b>									
<i>n</i> -tricosane	2291	2304	0.4	0.2	0.6	0.7	1.1	1.1	1.2
									<b>91.</b>
<b>Total identified (%)</b>			<b>91.3</b>	<b>90.6</b>	<b>93.7</b>	<b>88.9</b>	<b>95.4</b>	<b>90.5</b>	<b>5</b>
<b>Monoterpenes (%)</b>			1.0	1.4	0.6	0.6	0.6	0.2	1.0
									<b>98.</b>
<b>Sesquiterpenes (%)</b>			98.6	98.3	98.8	98.6	98.2	98.5	6
<b>Oil yield (w/w) (%)</b>			3.5	1.9	0.7	0.4	1.3	3.7	6.7
									1.4
									98
<b>Refractive index (20 °C)</b>			1.4940	1.4980	1.4965	1.4985	1.5016	1.4966	6

S: Spring buds; F1: fraction 0-60 min; F2: fraction 60-120 min; F3: fraction 120-180 min; F4: fraction 180-240 min; YL: young leaves; F: fall buds.

<sup>a</sup> Retention indices on apolar DB-5 column;

<sup>b</sup> Retention indices on polar Supelcowax 10 column;

\*: Tentatively identified.

**Table 2.** Cytotoxic activity ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) of *Populus balsamifera* essential oils from spring buds (S), young leaves (YL), fall buds (F), fractions (F1 to F4) according to Hoechst assay against A549 and DLD1 cell lines. Etoposide and chlorambucil were used as positive control and exhibited an  $IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$  and  $10 \mu\text{g/mL}$  respectively in two cell lines tested.

Essential oils and components	$IC_{50}^{a,b}$ values ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	A549	DLD-1
Spring buds essential oil (S)	$35 \pm 1$	$37 \pm 1$
Young leaves essential oil (YL)	$36 \pm 3$	$37 \pm 3$
Fall buds essential oil (F)	$47 \pm 2$	$50 \pm 1$
Spring buds essential oil (0-60 min fraction) (F1)	$41 \pm 4$	$44 \pm 3$
Spring buds essential oil (60-120 min fraction) (F2)	$28 \pm 3$	$26 \pm 2$
Spring buds essential oil (120-180 min fraction) (F3)	$24 \pm 1$	$23 \pm 2$
Spring buds essential oil (180-240 min fraction) (F4)	$26 \pm 3$	$26 \pm 3$
$\alpha$ -(-)-Bisabolol	$18 \pm 2$	$26 \pm 2$
<i>trans</i> -Nerolidol	$6.4 \pm 0.4$	$5.8 \pm 0.4$

<sup>a</sup> According to NCI criteria an extract or a pure compound is considered moderately active when  $IC_{50}$  is between  $49 \mu\text{g/ml}$  and  $10 \mu\text{g/ml}$  and strongly active when  $IC_{50}$  is between  $9 \mu\text{g/ml}$  and  $1 \mu\text{g/ml}$  (Boyd, 1997).

<sup>b</sup>  $IC_{50}$  values (concentration inhibiting cell growth by 50%).

**CHAPITRE 6****ARTICLE SCIENTIFIQUE:****“EFFICIENT SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF NATURAL** **$\alpha$ -BISABOLOL  $\beta$ -D-FUCOPYRANOSIDE AND ANALOGUES”**

## Résumé

L' $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**), un glycoside sesquiterpénique naturel et cytotoxique, a été synthétisé avec cinq autres glycosides d' $\alpha$ -bisabolol ( $\beta$ -D-glucoside,  $\beta$ -D-galactoside,  $\alpha$ -D-mannoside,  $\beta$ -D-xyloside and  $\alpha$ -L-rhamnoside). La réaction de glycosidation a été réalisée à l'aide de la procédure inverse de Schmidt avec d'excellents rendements (83-95%). La cytotoxicité des glycosides synthétisés a été évaluée vis-à-vis de différentes lignées cellulaires tumorales incluant celles de gliomes humains et murins (U-87, U-251, GL-261) car l'activité cytotoxique de l' $\alpha$ -bisabolol (**1**) contre des gliomes a déjà été démontrée. Dans la plupart des cas, l'addition d'une section sucre sur l' $\alpha$ -bisabolol (**1**) a eu pour effet d'améliorer significativement sa cytotoxicité. Parmi les glycosides synthétisés, l' $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**6b**) a exercé la plus forte activité avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre 40 et 64  $\mu$ M. D'après les prédictions ADME *in silico*, ce glycoside respecte les paramètres physicochimiques nécessaires pour traverser la barrière hémato-encéphalique de manière passive.

**Efficient Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Natural  
 $\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-Fucopyranoside and Analogues**

Marianne Piochon, Jean Legault, Charles Gauthier and André Pichette<sup>1</sup>

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

---

<sup>1</sup> Corresponding author. Tel: +1 418 545-5011; fax: +1 418 545-5012; e-mail: andre\_pichette@uqac.ca

**Abstract**

$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**), a naturally cytotoxic occurring bound volatile compound, was efficiently synthesized along with five other  $\alpha$ -bisabolol glycosides ( $\beta$ -D-glucoside,  $\beta$ -D-galactoside,  $\alpha$ -D-mannoside,  $\beta$ -D-xyloside and  $\alpha$ -L-rhamnoside). Glycosidation of a sesquiterpene alcohol was performed using Schmidt's inverse procedure and provided excellent yields (83-95%). Cytotoxicity was evaluated against a broad panel of cancerous cell lines including human and rat glioma (U-87, U-251, GL-261).  $\alpha$ -bisabolol (**1**) cytotoxicity against brain tumor cell lines has been previously demonstrated. The addition of a sugar moiety markedly increased  $\alpha$ -bisabolol (**1**) cytotoxicity in most cases. Among the synthesized glycosides,  $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**6b**) exerted the strongest activity with  $IC_{50}$  ranging from 40 to 64  $\mu$ M. According to ADME *in silico* predictions, this glycoside closely respects physicochemical parameters necessary to cross the blood-brain barrier passively.

**Keyword Index:**  $\alpha$ -Bisabolol; Sesquiterpene; Glycoside; Cytotoxicity; Glioma; Blood-brain barrier.

## 1. Introduction

$\alpha$ -(-)-Bisabolol (**1**) (Figure 1), a nontoxic sesquiterpenic alcohol, is widely used in fragrances and cosmetic preparations.<sup>1</sup> This oily compound with a sweet floral odor is frequently found in essential oils of various plants such as chamomile (*Matricaria chamomilla*), which may contain up to 50%.<sup>2</sup>  $\alpha$ -Bisabolol (**1**) is well known for its anti-inflammatory properties<sup>3,4</sup> and for its ability to enhance *in vitro* transepidermal drug penetration.<sup>5</sup> Recently, Cavalieri *et al.*<sup>6,7</sup> have shown that  $\alpha$ -bisabolol (**1**) exhibits a cytotoxic apoptosis-inducing effect against human glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines.<sup>8</sup>

Like many natural sesquiterpenes,  $\alpha$ -bisabolol (**1**) exists in the plant kingdom as a glycosidically bound volatile compound.<sup>9</sup> Indeed,  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**) (Figure 1) was already isolated from the aerial parts of *Carthamus lanatus*<sup>10</sup> and exhibited noticeable cytotoxic activity by the *Artemia salina* assay.<sup>11</sup>  $\alpha$ -Bisabolol (**1**) is a lipophilic compound and, consequently, it is poorly soluble in biological fluids. This physicochemical property limits its possible pharmacological applications. However, glycosidation of a molecule increases its hydrophilicity and thereby influences its physicochemical and pharmacokinetic properties.<sup>12</sup> Moreover, glycosidation can also improve the permeability through biological barriers such as the blood-brain barrier.<sup>13,14</sup> Thus, we thought that it would be of interest to synthesize  $\alpha$ -bisabolol glycosides and study their pharmacological

potential especially as very few reports about glycosidation of volatile compounds are currently available.

In this work, we report the synthesis of *O*-glycoside derivatives of  $\alpha$ -bisabolol (**1**). Cytotoxicity of pure compounds was evaluated *in vitro* against several tumor cell lines including human and rat glioma (U-87, U-251, GL-261). Also, in order to estimate the potential of  $\alpha$ -bisabolol glycosides to cross through the blood-brain barrier, we evaluated *in silico* some important pharmacokinetic parameters ( $\log P$ , PSA, HBD)<sup>15</sup> using the ADME prediction program QikProp<sup>16</sup> version 2.5.

## 2. Results and Discussion

**Synthesis.** Quite surprisingly, studies on the glycosidation of volatile compounds are scarce in the literature whereas many surveys have been published on the isolation of glycosidically bounded volatiles.<sup>9</sup> Only a few reports about the synthesis of monoterpenyl or phenylpropanoid glycosides by chemical methods<sup>17-19</sup> or biotransformation<sup>20</sup> are currently available and these approaches generally provide low yields. For the synthesis of  $\alpha$ -bisabolol glycosides, we chose to use the trichloroacetimidate (TCA) method of Schmidt.<sup>21</sup> This method usually provides higher yields than the Koenigs-Knorr procedure and it has never been used previously for the glycosidation of volatile compounds.

TCA activated sugars were prepared from D-galactose,<sup>22</sup> D-mannose,<sup>23</sup> D-xylose,<sup>24</sup> L-rhamnose<sup>25</sup> and D-glucose<sup>25</sup> following procedures previously reported in the literature. As shown in Scheme 1, the sugar was first benzoylated with benzoyl chloride with DMAP as the catalyst to afford the perbenzoyl derivative (**2**, 94%). Selective deprotection of the anomeric position was achieved by bromination with HBr/HOAc, followed by basic hydrolysis with silver carbonate. The TCA derivative (**4**, 71%) was prepared according to Schmidt's procedure<sup>21</sup> using trichloroacetonitrile and cesium carbonate (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) as catalyst.<sup>26</sup>

The synthesis of  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**) was achieved according to the reaction sequence shown in Table 1. Lewis acid trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) was used as the promoter of the reaction. Water is undesirable since it is a competitive acceptor, so the reaction was performed under rigorously anhydrous conditions. Glycosidation was first performed following the normal procedure<sup>27</sup> at room temperature in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> using a catalytic amount of TMSOTf but dehydration of the tertiary alcohol was observed. Indeed, GC-MS analysis showed the formation of a complex mixture with  $\alpha$ -bisabolene as a major compound (data not shown). To circumvent this problem, we performed the glycosidation reaction at -78 °C using the inverse procedure<sup>28</sup> in which catalytic TMSOTf and  $\alpha$ -bisabolol (**1**) are mixed before the dropwise TCA addition. Fully protected  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5a-10a**) were obtained after 2.5 h at low temperatures (-78 to -20 °C) in excellent yields (83-95%). Thereafter, deprotection of the benzoyl groups (NaOH, MeOH/THF/H<sub>2</sub>O 1:2:1) afforded  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**) in isolated

yields ranging from 56 to 98%. The configuration of the glycosidic linkage of molecules **5b-10b** was determined by the chemical shifts and the vicinal coupling constants of the anomeric protons in  $^1\text{H}$  NMR experiments.<sup>29</sup> As expected, 1,2-*trans*-glycosides were exclusively obtained because of the presence of benzoyl protecting groups at the position 2 of sugar TCA which directed the anomeric selectivity of the glycosidation reaction.<sup>30</sup> The structures of the sesquiterpene glycosides were confirmed by 1D and 2D NMR experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC) and HRMS. The physical and analytical data ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and  $[\alpha]_D^{25}$ ) of  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**) were in agreement with those reported for the natural product isolated from *Carthamus lanatus*.<sup>10</sup>

**Anticancer Evaluation.**  $\alpha$ -Bisabolol (**1**) and synthesized  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**) were evaluated for their anticancer activity against a broad panel of tumor cell lines. The panel comprised human lung carcinoma (A549), colon adenocarcinoma (DLD-1), breast adenocarcinoma (MCF-7), melanoma (SK-MEL-2), ovary teratocarcinoma (PA-1), prostate adenocarcinoma (PC-3), pancreas adenocarcinoma (PANC 05.04), glioma (U-251), glioblastoma (U-87) and murine glioma (GL-261). Assessments were also carried out on normal human skin fibroblasts (WS1). Inhibition of growth cells was assessed by DNA quantification using Hoechst assay<sup>31</sup> and results are presented in Table 2. They are expressed as the concentration ( $\mu\text{M}$ ) inhibiting 50% of the cell growth ( $\text{IC}_{50}$ ).

Recently, strong anticancer activity for  $\alpha$ -bisabolol (**1**) against U-87 glioma cells ( $\text{EC}_{50}$  2  $\mu\text{M}$ ) has been reported in the literature.<sup>6</sup> However, in our study,  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was found

to be weakly cytotoxic against U-87 with an  $IC_{50}$  of 130  $\mu M$ . This difference may be explained by the fact that Cavalieri *et al.*<sup>6</sup> calculated the  $EC_{50}$  value estimating that only 2.5% of the initial amount of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) was dissolved in the culture medium used for biological assays.

On the whole,  $\alpha$ -bisabolol glycosides exhibited stronger activity than the aglycone **1** except for  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-galactopyranoside (**9b**) ( $IC_{50} >100 \mu M$ ). As shown in Table 2,  $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**6b**) was the most potent glycoside: pronounced cytotoxic activity was observed for all tumor cell lines especially against A549 ( $IC_{50} 40 \mu M$ ) and PA-1 ( $IC_{50} 40 \mu M$ ). These results were significantly different to those obtained for **1** ( $IC_{50} >100 \mu M$ ,  $P <0.05$ ). With brain tumor cell lines (U-251, U-87 and GL-261), cellular growth inhibitions were also observed for glycoside **6b** ( $IC_{50} 46-58 \mu M$ ) with significant differences compared to the activity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) ( $P <0.05$ ). Moreover,  $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -D-mannopyranoside (**10b**) provided also moderate inhibitory effects particularly against MCF-7 ( $IC_{50} 45 \mu M$ ) and GL-261 ( $IC_{50} 44 \mu M$ ) cancer cell lines. Therefore, these preliminary cytotoxic results showed that adding a sugar moiety may improve the cytotoxic activity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) depending on the nature of the glycone. Furthermore, since  $\alpha$ -bisabolol (**1**) and sugar moieties are natural compounds devoid of toxicity,<sup>1</sup> we may suppose that resulting glycosides should also be biocompatible. However, further *in vivo* biological assays are needed to confirm this hypothesis.

***In Silico* Prediction of Pharmacokinetic Parameters.** The major difficulty in the discovery of anti-glioma drugs is to find active compounds which must be nontoxic, sufficiently soluble in blood to be bioavailable and sufficiently lipophilic to pass through the blood-brain barrier (BBB). Many promising anti-glioma drugs are discarded because they do not respect one of these conditions. Glycosidation is an interesting method to improve the water solubility of hydrophobic compounds.<sup>12</sup> However, it is less well known that the addition of a sugar moiety can also enhance the BBB permeability. This seems paradoxical but it has already been reported that glycosidation of neuropeptides can enhance their entry into the brain.<sup>14</sup>

The *in silico* prediction of pharmacokinetic parameters is a useful tool which allows estimating the ability of compounds to pass through the BBB based on its physicochemical properties. Hitchcock and Pennington<sup>15</sup> have recently established a list of parameters involved in the BBB penetration and their optimal values based on the 25 top-selling central nervous system drugs in 2004. Suggested physicochemical property ranges for increasing the potential for BBB penetration are shown in Table 3. Important parameters are molecular mass (MW, g·mol<sup>-1</sup>), hydrogen bond donor (HBD), polar surface area (PSA, Å) and lipophilicity which is indicated by the calculated partition coefficient (clog *P*). The ADME prediction program QikProp<sup>16</sup> version 2.5 was used to evaluate these parameters *in silico*. As shown in Table 3,  $\alpha$ -bisabolol (**1**) falls within the limits for passing through the BBB. However, the lipophilic character of **1** (clog *P* = 4.3) may decrease its bioavailability and, consequently, limits its chances to reach the BBB. If we compare the two most active

glycosides against glioma cell lines (**6b** and **10b**),  $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**6b**) fits within the limits for passing through the BBB (clog  $P$  = 2.8; MW = 368.3 g/mol, PSA = 74.8 Å). In fact, for the glycoside **6b**, the HBD (= 3) is the only parameter not satisfied since the suggested limit is less than 3. Furthermore, the additional alcohol at C-6 in the  $\alpha$ -bisabolol glycosides derivated from the three hexoses (**8b-10b**) apparently does not allow them to fulfil the permeability conditions (HBD >3; PSA >90 Å). Consequently, this *in silico* study suggests that the lipophilicity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) has been decreased by the addition of a rhamnose moiety without dramatically altering its capacity to pass through biological barriers especially the BBB. It would be interesting to confirm this hypothesis with an *in vitro* model of the BBB which imitates the *in vivo* situation.

## Conclusion

The synthesis of a series of  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**), including the natural  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**), was achieved. Glycosidation of a sesquiterpene alcohol was performed using Schmidt's procedure and provided excellent yields. The biological screening showed that glycosidation improves the cytotoxic activity of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) especially when adding  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside or  $\alpha$ -D-mannopyranoside moieties. With glioma cells lines,  $\alpha$ -bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**6b**) was much more active than  $\alpha$ -bisabolol (**1**) itself, and according to *in silico* predictions, this glycoside closely fits with physicochemical parameters necessary to cross the BBB passively. Other functional groups could be attached to the  $\alpha$ -bisabolol (**1**) structure. For example, some specific bioremovable

moieties could be introduced with the aim of focusing on definite organs especially when brain delivery is targeted.<sup>32</sup> Such structural modifications of  $\alpha$ -bisabolol (**1**) are currently in progress in our laboratory.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Air and water sensitive reactions were performed in flame-dried glassware under argon atmosphere. Moisture sensitive reagents were introduced via a dry syringe. Dichloromethane was distilled from  $\text{CaH}_2$  and THF was distilled from sodium with benzophenone ketyl. Flash column chromatography was carried out using 60-230 mesh silica gel or a high performance flash chromatography system (HPFC-Analogix F12-40) equipped with a silica gel column (F12-M, 8 g). Analytical thin layer chromatography was performed with silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm pre-coated TLC plates and visualized using UV<sub>254</sub> and cerium molybdate (2 g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4$ , 5 g  $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ , 200 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , and 20 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) with charring. All of the chemical yields are not optimized and generally represent the result of the mean of two experiments.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at 400 MHz and  $^{13}\text{C}$  NMR were recorded at 100 MHz on an Avance 400 Bruker spectrometer equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, COSY, HSQC, and HMBC NMR experiments. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent peaks or trimethylsilane (TMS). Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), br s (broad singlet), br t (broad triplet), and

coupling constants are reported in Hertz (Hz). The labile *OH* NMR signals appearing sometimes were not listed. Optical rotations were obtained using sodium D line at ambient temperature on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. Melting points are uncorrected. High resolution electrospray ionization mass spectral data (HR-ESI-MS) were obtained at the department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada.

**Synthesis of 1,2,3,4-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-fucopyranose (2).** Benzoyl Chloride (4 mL, 36.5 mmol) was slowly added to an ice-cold solution of D-fucose (1 g, 6 mmol) in anhydrous pyridine (13 mL) with DMAP (74 mg, 0.609 mmol) as catalyst. The reaction was stirred overnight at room temperature and then quenched with MeOH (15 mL). The mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with cold 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO<sub>4</sub>) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 4:1 to 7:3) to give **2** as a white foam (3.33 g, 94%); *R*<sub>f</sub> 0.50 (hexanes/EtOAc, 7:3); mp 73-75 °C;  $[\alpha]_D^{25} +239.8$  (*c* 1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR spectral data of **2**<sup>33</sup> were in agreement with those published in the literature. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 16.3 (C-6), 67.7 (C-2), 68.0 (C-5), 69.9 (C-3), 71.5 (C-4), 90.9 (C-1), 128.8-133.9 (C-Ar), 164.8, 165.7, 165.9, 166.0 (4 $\times$  C=O); HR-ESI-MS *m/z* 603.1609 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>Na, 603.1631).

**Synthesis of 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha,\beta$ -D-fucopyranose (3).** HBr/HOAc (3 mL, 33%) was added under Ar to a solution of **2** (2.43 g, 4.2 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2.5 h, then the solution was washed with

saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and brine. The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in acetone (22 mL), water (0.9 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL). Silver carbonate (2.02 g, 7.3 mmol) was added in portions and the reaction was stirred for 1 h at room temperature, then the mixture was filtered through a bed of celite and anhydrous MgSO<sub>4</sub>. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 7:3 to 3:2) to give **3** ( $\alpha$ : $\beta$  = 5:1) as a white foam (1.74 g, 85%): *R*<sub>f</sub> 0.22 and 0.35 (hexanes/EtOAc, 7:3); mp 75-77 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  +220.7 (*c* 1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); lit.<sup>33</sup>  $[\alpha]_D^{22}$  +247.4 (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR spectral data of **3**<sup>33</sup> were in agreement with those published in the literature. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) (anomer  $\alpha$ )  $\delta$ : 16.3 (C-6), 65.0 (C-5), 68.4 (C-3), 69.5 (C-2), 72.0 (C-4), 91.0 (C-1), 128.4-133.8 (C-Ar), 165.8, 166.1, 166.2 (3× C=O); HR-ESI-MS *m/z* 477.1547 [M+H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub>, 477.1549).

**Synthesis of 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-fucopyranosyl trichloroacetimidate (4).** CCl<sub>3</sub>CN (2 mL, 20.1 mmol) was added to a solution of **3** (1.6 g, 3.36 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (219 mg, 0.67 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (27 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then filtered off. The solvents of the filtrate were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 7:3) to give **4** as a white foam (1.6 g, 71%): *R*<sub>f</sub> 0.41 (hexanes/EtOAc, 7:3); mp 70-72 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  +183.2 (*c* 1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); lit.<sup>34</sup>  $[\alpha]_D^{24}$  +196.0 (CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data of **4**<sup>33</sup> were in agreement with those published in the literature. HR-ESI-MS *m/z* 642.0465 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>8</sub>NaCl<sub>3</sub>, 642.0465).

**General procedure for the synthesis of benzoylated  $\alpha$ -bisabolol glycosides (5a-10a).** A solution of  $\alpha$ -bisabolol (1 equiv, **1**) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $10 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) was stirred for 15 min with 4 Å molecular sieves at  $-78 \text{ }^\circ\text{C}$  in an ice  $\text{CO}_2$ /acetone bath. TMSOTf (0.1 equiv) was added under argon while keeping rigorous anhydrous conditions. Then, a solution of imidate (2 equiv) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) cooled at  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  was added dropwise over 5 min with continuous stirring. The reaction was allowed to warm to  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  over 2.5 h. When no  $\alpha$ -bisabolol (**1**) could be detected by TLC, the reaction was quenched by addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (4 equiv). The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash chromatography.

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-fucopyranoside (5a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu\text{L}$ , 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-fucopyranosyl trichloroacetimidate<sup>34</sup> (285 mg, 0.460 mmol, **4**). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 19:1 to 9:1) afforded **5a** as a white foam (138 mg, 88%):  $R_f$  0.59 (hexanes/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_D^{25} +95.0$  ( $c$  1.00,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); mp  $147\text{-}149^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.95 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.06 (s, 3H, H-14), 1.30 (d, 3H,  $J = 6.2 \text{ Hz}$ , H'-6), 1.46 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.55 (s, 3H, H-15), 1.59 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.60 (s, 3H, H-12), 1.64 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.73 (m, 1H, H-6), 1.76 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.83 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 1.85 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.97 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.27 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 4.03 (dd, 1H,  $J = 12.9 \text{ Hz}$ ,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , H'-5), 4.92 (d, 1H,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , H'-1), 5.06 (br t, 1H,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ , H-10), 5.18 (br s, 1H, H-2), 5.56 (dd, 1H,  $J = 10.5 \text{ Hz}$ ,  $J = 3.5 \text{ Hz}$ , H'-3), 5.69 (d, 1H,  $J = 3.3 \text{ Hz}$ , H'-4), 5.78 (dd, 1H,  $J = 10.5$

Hz,  $J = 7.8$  Hz, H'-2), 7.19-7.27 (m, 2H, H-Ar), 7.31-7.44 (m, 3H, H-Ar), 7.45-7.53 (m, 3H, H-Ar), 7.56-7.65 (m, 1H, H-Ar), 7.73-7.81 (m, 2H, H-Ar), 7.88-8.00 (m, 2H, H-Ar), 8.09-8.20 (m, 2H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  703.3281  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Na}$ , 703.3246).

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (6a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu\text{L}$ , 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl trichloroacetimidate<sup>25</sup> (284 mg, 0.460 mmol). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1) afforded **6a** as a white foam (150 mg, 95%):  $R_f$  0.44 (hexanes/Et<sub>2</sub>O 4:1);  $[\alpha]_D^{25} +89.3$  ( $c$  1.00,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); mp 44-46 °C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.27 (s, 3H, H-14), 1.32 (d, 3H,  $J = 6.2$  Hz, H'-6), 1.43 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.59 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.62 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.65 (s, 3H, H-12), 1.69 (s, 6H, H-13, H-15), 1.84 (m, 1H, H-6), 1.94 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.98 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 2.01 (m, 2H, H-1 $\beta$ , H-4 $\alpha$ ), 2.06 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 2.08 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.10 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 4.36 (m, 1H, H'-5), 5.13 (br t, 1H,  $J = 7$  Hz, H-10), 5.32 (br s, 1H, H'-1), 5.43 (br s, 1H, H-2), 5.48 (m, 1H, H'-2), 5.69 (t, 1H,  $J = 9.7$  Hz, H'-4), 5.86 (dd, 1H,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, H'-3), 7.23-7.31 (m, 2H, H-Ar), 7.35-7.45 (m, 3H, H-Ar), 7.46-7.55 (m, 3H, H-Ar), 7.57-7.63 (m, 1H, H-Ar), 7.83-7.87 (m, 2H, H-Ar), 7.98-8.02 (m, 2H, H-Ar), 8.09-8.14 (m, 2H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  703.3274  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Na}$ , 703.3246).

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (7a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu\text{L}$ , 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-xylopyranosyl

trichloroacetimidate<sup>24</sup> (278 mg, 0.460 mmol). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1) afforded **7a** as a white foam (145 mg, 95%):  $R_f$  0.69 (hexanes/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_D^{25}$  -43.6 ( $c$  1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.97 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.10 (s, 3H, H-14), 1.51 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.56 (s, 3H, H-15), 1.59 (s, 3H, H-12), 1.61 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.68 (m, 1H, H-6), 1.69 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.72 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.74 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.80 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 1.83 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.94 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.16 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 3.63 (dd, 1H,  $J$  = 11.9 Hz,  $J$  = 8.1 Hz, H'-5 $\alpha$ ), 4.43 (dd, 1H,  $J$  = 11.9 Hz,  $J$  = 4.6 Hz, H'-5 $\beta$ ), 5.00 (d, 1H,  $J$  = 6.2 Hz, H'-1), 5.10 (br t, 1H,  $J$  = 7.1 Hz, H-10), 5.18 (br s, 1H, H-2), 5.32 (m, 1H, H'-4), 5.42 (dd, 1H,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 6.2 Hz, H'-2), 5.79 (t, 1H,  $J$  = 8.1 Hz, H'-3), 7.29-7.43 (m, 6H, H-Ar), 7.44-7.59 (m, 3H, H-Ar), 7.88-8.04 (m, 6H, H-Ar); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  689.3083 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>Na, 689.3090).

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (8a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu$ L, 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate<sup>25</sup> (340 mg, 0.460 mmol). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 4:1) afforded **8a** as a white foam (143 mg, 85%):  $R_f$  0.26 (hexanes/EtOAc 4:1);  $[\alpha]_D^{25}$  -11.5 ( $c$  1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); mp 139-141 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.00 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.10 (s, 3H, H-14), 1.47 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.50 (s, 3H, H-15), 1.53 (s, 3H, H-12), 1.56 (s, 3H, H-13), 1.62 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.63 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.64 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.68 (m, 1H, H-6), 1.69 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.76 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 1.80 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.94 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.14 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 4.15 (m, 1H, H'-5), 4.45 (dd, 1H,  $J$  = 12.1 Hz,  $J$  =

5.9 Hz, H'-6 $\alpha$ ), 4.58 (dd, 1H,  $J = 12.1$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, H'-6 $\beta$ ), 4.98 (br t, 1H,  $J = 6.7$  Hz, H-10), 5.04 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H'-1), 5.11 (br s, 1H, H-2), 5.58 (m, 1H, H'-2), 5.64 (m, 1H, H'-4), 5.93 (m, 1H, H'-3), 7.22-7.30 (m, 2H, H-Ar), 7.30-7.43 (m, 7H, H-Ar), 7.44-7.57 (m, 3H, H-Ar), 7.79-7.86 (m, 2H, H-Ar), 7.85-7.97 (m, 4H, H-Ar), 7.98-8.05 (m, 2H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  823.3429  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Na}$ , 823.3458).

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (9a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu\text{L}$ , 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl trichloroacetimidate<sup>22</sup> (340 mg, 0.460 mmol). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 19:1 to 9:1) afforded **9a** as a white foam (147 mg, 90%):  $R_f$  0.67 (hexanes/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_D^{25} +226.1$  ( $c$  0.5,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); mp 57-59  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.00 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.10 (s, 3H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.52 (s, 3H, H-15), 1.59 (s, 6H, H-12, H-13), 1.56 (s, 3H, H-13), 1.62 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.65 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.67 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.71 (m, 1H, H-6), 1.73 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.78 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 1.80 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.98 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.22 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 4.29 (t, 1H,  $J = 6.5$  Hz, H'-5), 4.41 (dd, 1H,  $J = 11.3$  Hz,  $J = 6.2$  Hz, H'-6 $\alpha$ ), 4.57 (dd, 1H,  $J = 11.1$  Hz,  $J = 6.8$  Hz, H'-6 $\beta$ ), 5.01 (m, 2H, H'-1, H-10), 5.14 (br s, 1H, H-2), 5.62 (dd, 1H,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, H'-3), 5.83 (dd, 1H,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 7.8$  Hz, H'-2), 5.98 (d, 1H,  $J = 2.9$  Hz, H'-4), 7.20-7.29 (m, 2H, H-Ar), 7.33-7.46 (m, 5H, H-Ar), 7.46-7.65 (m, 5H, H-Ar), 7.75-7.83 (m, 2H, H-Ar), 7.91-7.98 (m, 2H, H-Ar), 7.99-8.05 (m, 2H, H-Ar), 8.06-8.14 (m, 2H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  823.3441  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Na}$ , 823.3458).

**$\alpha$ -Bisabolol 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (10a).** This compound was prepared from  $\alpha$ -bisabolol (55  $\mu$ L, 0.230 mmol, **1**) and 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl trichloroacetimidate<sup>23</sup> (340 mg, 0.460 mmol). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 19:1 to 9:1) afforded **10a** as a white foam (152 mg, 83%):  $R_f$  0.66 (hexanes/EtOAc 7:3);  $[\alpha]_D^{25}$  -61.6 ( $c$  0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); mp 56-58 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.27 (s, 3H, H-14), 1.45 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.60 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.62 (s, 3H, H-12), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.68 (s, 3H, H-15), 1.69 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.87 (m, 1H, H-6), 1.93 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 2.02 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 2.03 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 2.04 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 2.07 (m, 2H, H-9), 2.13 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 4.48 (m, 1H, H'-6 $\alpha$ ), 4.60 (m, 1H, H'-5), 4.62 (m, 1H, H'-6 $\beta$ ), 5.13 (br t, 1H,  $J$  = 7.0 Hz, H-10), 5.41 (m, 2H, H-2, H'-1), 5.53 (m, 1H, H'-2), 5.94 (dd, 1H,  $J$  = 10.2 Hz,  $J$  = 3.2 Hz, H'-3), 6.10 (t, 1H,  $J$  = 10.0 Hz, H'-4), 7.23-7.31 (m, 2H, H-Ar), 7.33-7.46 (m, 7H, H-Ar), 7.47-7.64 (m, 3H, H-Ar), 7.81-7.89 (m, 2H, H-Ar), 7.94-8.03 (m, 2H, H-Ar), 8.04-8.13 (m, 4H, H-Ar); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) see Table 4; HR-ESI-MS  $m/z$  823.3447  $[M+Na]^+$  (calcd for C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>Na, 823.3458).

**General procedure for the deprotection of benzoylated  $\alpha$ -bisabolol glycosides (5b-10b).** The benzoylated  $\alpha$ -bisabolol glycoside (1 equiv) was dissolved in a NaOH 0.25 N (20 equiv) solution of MeOH/THF/H<sub>2</sub>O 1:2:1 (15 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solution was neutralized to pH  $\approx$ 7 with a suspension of amberlite IR-120 activated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. After filtration and evaporation of the solvents under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography.

**$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (5b).** **5a** (120 mg, 0.176 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by HPFC (hexanes/EtOAc 7:3 to 3:7) to afford **5b** as an oil (64 mg, 98%):  $R_f$  0.38 (EtOAc);  $[\alpha]_D^{25}$  -18.7 ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.<sup>10</sup>  $[\alpha]_D$  -20.6 ( $c$  0.97,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.13 (s, 3H, H-14), 1.25 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.27 (d, 3H,  $J$  = 6.4 Hz, H'-6), 1.46 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.57 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.59 (s, 3H, H-12), 1.63 (s, 3H, H-15), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.75 (m, 1H, H-6), 1.76 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.92 (m, 2H, H-4 $\alpha,\beta$ ), 1.94 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.96 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.98 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.15 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 3.56 (m, 1H, H'-5), 3.57 (m, 1H, H'-3), 3.62 (m, 1H, H'-2), 3.70 (br s, 1H, H'-4), 4.37 (d,  $J$  = 7.1 Hz, H'-1), 5.04 (br t, 1H,  $J$  = 6.2 Hz, H-10), 5.34 (br s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 5; HR-ESI-MS  $m/z$  391.2452  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}$ ), 391.2460.

**$\alpha$ -Bisabolol  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (6b).** **6a** (96.6 mg, 0.142 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 4:1 to EtOAc 100%) to afford **6b** as a colorless gum (49.4 mg, 95%):  $R_f$  0.38 (EtOAc);  $[\alpha]_D^{25}$  -58.6 ( $c$  0.50,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (MeOD)  $\delta$ : 1.16 (s, 3H, H-14), 1.21 (d, 3H,  $J$  = 6.4 Hz, H'-6), 1.30 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.54 (m, 2H, H-8), 1.61 (s, 3H, H-12), 1.63 (s, 3H, H-15), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.71 (m, 1H, H-6), 1.86 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.88 (m, 2H, H-1), 1.96 (m, 2H, H-4), 2.01 (m, 1H, H-9), 3.36 (m, 1H, H'-3), 3.68 (m, 1H, H'-2), 3.70 (m, 1H, H'-4), 3.76 (m, 1H, H'-5), 4.95 (s, 1H, H'-1), 5.09 (br t, 1H,  $J$  =

7.1 Hz, H-10), 5.36 (br s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) see Table 5; HR-ESI-MS  $m/z$  391.2441  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}$ , 391.2460).

**$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-xylopyranoside (7b).** **7a** (135 mg, 0.203 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 7:3 to 3:7) to afford **7b** as a white powder (62.4 mg, 87%):  $R_f$  0.38 (EtOAc);  $[\alpha]_D^{25}$  -50.8 ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (MeOD/ $\text{CDCl}_3$  1:1)  $\delta$ : 1.17 (s, 3H, H-14), 1.28 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.48 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.60 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.61 (s, 3H, H-12), 1.64 (s, 3H, H-15), 1.67 (s, 3H, H-13), 1.76 (m, 1H, H-6), 1.81 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.91 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.97 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 1.98 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.99 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 2.01 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 2.15 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 3.18 (m, 1H, H'-5 $\beta$ ), 3.23 (m, 1H, H'-2), 3.35 (m, 1H, H'-3), 3.54 (m, 1H, H'-4), 3.85 (dd, 1H,  $J = 11.4$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, H'-5 $\alpha$ ), 4.44 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H'-1), 5.06 (br t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, H-10), 5.36 (br s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD/ $\text{CDCl}_3$  1:1) see Table 5; HR-ESI-MS  $m/z$  355.2498  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{O}_5$ , 355.2484).

**$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-glucopyranoside (8b).** **8a** (203 mg, 0.254 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 1:1 to EtOAc 100%) to afford **8b** as a white powder (79.8 mg, 82%):  $R_f$  0.22 (EtOAc);  $[\alpha]_D^{25}$  -26.0 ( $c$  1.00, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (MeOD)  $\delta$ : 1.18 (s, 3H, H-14), 1.27 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.47 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.60 (s, 3H, H-12), 1.62 (s, 3H, H-15), 1.64 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.66 (s, 3H, H-13), 1.74 (m, 1H, H-6), 1.82 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.90 (m, 1H, H-4 $\alpha$ ), 1.93 (m, 1H, H-4 $\beta$ ), 2.01 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 2.02 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.06 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 2.16 (m, 1H,

H-9 $\beta$ ), 3.17 (m, 1H, H'-2), 3.22 (m, 1H, H'-5), 3.31 (m, 1H, H'-4), 3.35 (m, 1H, H'-3), 3.65 (dd, 1H,  $J = 11.6$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, H'-6 $\alpha$ ), 3.80 (dd, 1H,  $J = 11.7$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, H'-6 $\beta$ ), 4.47 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H'-1), 5.10 (br t, 1H,  $J = 6.3$  Hz, H-10), 5.35 (br s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) see Table 5; HR-ESI-MS  $m/z$  407.2392  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}$ , 407.2409).

**$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-galactopyranoside (9b).** **9a** (47 mg, 0.059 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 1:1 to EtOAc 100%) to afford **9b** as a colorless gum (20.1 mg, 89%):  $R_f$  0.49 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1);  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -8.8 ( $c$  0.30, pyridine);  $^1\text{H}$  NMR (MeOD)  $\delta$ : 1.17 (s, 3H, H-14), 1.27 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.48 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.60 (s, 3H, H-12), 1.62 (s, 3H, H-15), 1.63 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.66 (s, 3H, H-13), 1.74 (m, 1H, H-6), 1.83 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.96 (m, 2H, H-4), 2.00 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 2.01 (m, 1H, H-9 $\alpha$ ), 2.06 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 2.16 (m, 1H, H-9 $\beta$ ), 3.45 (m, 1H, H'-5), 3.47 (m, 1H, H'-3), 3.49 (m, 1H, H'-2), 3.64 (dd, 1H,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, H'-6 $\alpha$ ), 3.72 (dd, 1H,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 6.8$  Hz, H'-6 $\beta$ ), 3.86 (m, 1H, H'-4), 4.43 (d, 1H,  $J = 7.0$  Hz, H'-1), 5.07 (br t, 1H,  $J = 6.8$  Hz, H-10), 5.35 (br s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) see Table 5; HR-ESI-MS  $m/z$  407.2391  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}$ , 407.2409).

**$\alpha$ -Bisabolol  $\alpha$ -D-mannopyranoside (10b).** **10a** (135 mg, 0.169 mmol) was treated according to the corresponding general procedure. The residue was purified by HPFC (hexanes/EtOAc 2:3 to EtOAc 100%) to afford **10b** as a white powder (36.4 mg, 56%):  $R_f$

0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +8.5 (*c* 0.50, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.12 (s, 3H, H-14), 1.27 (m, 1H, H-5 $\alpha$ ), 1.45 (m, 1H, H-8 $\alpha$ ), 1.57 (m, 1H, H-8 $\beta$ ), 1.58 (s, 3H, H-12), 1.63 (s, 3H, H-15), 1.66 (s, 3H, H-13), 1.70 (m, 1H, H-6), 1.78 (m, 1H, H-1 $\alpha$ ), 1.85 (m, 1H, H-5 $\beta$ ), 1.88 (m, 2H, H-9), 1.90 (m, 1H, H-1 $\beta$ ), 1.93 (m, 2H, H-4), 3.70 (m, 1H, H'-6 $\alpha$ ), 3.72 (m, 1H, H'-5), 3.81 (m, 1H, H'-2), 3.91 (m, 1H, H'-3), 3.98 (m, 1H, H'-6 $\beta$ ), 3.99 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H'-4), 5.05 (br t, 1H, *J* = 6.4 Hz, H-10), 5.12 (s, 1H, H'-1), 5.34 (br s, 1H, H-2); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) see Table 5; HR-ESI-MS *m/z* 407.2392 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>Na, 407.2409).

**Cell lines and culture conditions.** All human (A549, DLD-1, U-251, U-87, PANC 04.05, PC-3, PA-1, MEL-2, MCF-7, WS1) and rat (GL-261) cells lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA) to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone) and vitamins (1 $\times$ ) (Mediatech Cellgro, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO<sub>2</sub>.

**Cytotoxicity assay.** Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at the density of 5  $\times$  10<sup>3</sup> cells per well in 100  $\mu$ L of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100  $\mu$ L per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed with cellular

DNA assay using Hoechst dye 33342.<sup>31</sup> Cell lysis was performed by adding a solution of SDS (0.01%) at -80 °C before the Hoechst assay was carried out. Measurements were performed on an automated 96-well fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 365 and 460 nm. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Etoposide was used as positive control. Each experiment was carried out twice in triplicate. IC<sub>50</sub> results were expressed as means ± standard deviation.

**Statistical analysis.** Data were subjected to analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Student-Newman Keuls post-hoc test and were considered significantly different when  $P < 0.05$ . All computations were done using statistical software Sigma-Stat version 3.5.

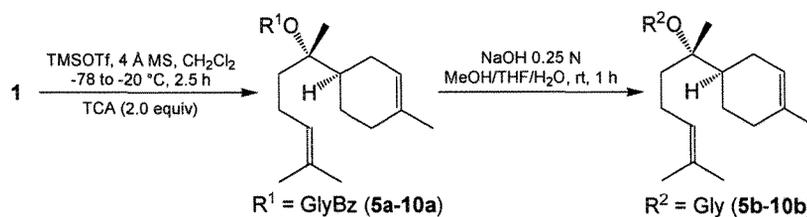
**Acknowledgements.** The authors thank François-Xavier Garneau and Karl Girard-Lalancette for help and suggestions and Philippe Dufour for his assistance in organic synthesis. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestier 02) and Chaire de Recherche sur les Agents Anticancéreux d'Origine Naturelle are gratefully acknowledged.

**References and Notes**

- (1) Madhavan, B. N. *Int. J. Toxicol.*, **18**, 33—40 (1999).
- (2) Issac, O. *Planta Med.*, **35**, 118—124 (1979).
- (3) Thiele, K.; Jakovlev, V.; Isaac, O.; Schuler, W. A. *Arzneim. Forsch.*, **19**, 1878—1882 (1969).
- (4) Jakovlev, V.; Isaac, O.; Thiemer, K.; Kunde R. *Planta Med.*, **35**, 125—140 (1979).
- (5) Kadir, R.; Barry, B. W. *Int. J. Pharm.*, **70**, 87—94 (1991).
- (6) Cavalieri, E.; Mariotto, S.; Fabrizi, C.; Carcereri de Prati, A.; Gottado, R.; Leone, S.; Berra, L. V.; Lauro, G. M.; Ciampa, A. R.; Suzuki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 589—594 (2004).
- (7) Darra, E.; Abdel-Azeim, S.; Manara, A.; Shoji, K.; Maréchal, J.-D.; Mariotto, S.; Cavalieri, E.; Perbellini, L.; Pizza, C.; Perahia, D.; Crimi, M.; Suzuki, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 113—123 (2008).
- (8) Modzelewska, A.; Sur, S.; Kumar, S. K.; Khan, S. R. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **5**, 477—499 (2005).
- (9) Stahl-Biskup, E.; Intert, F.; Holthuijzen, M.; Stengele, M.; Schulz, G. *Flavour Frag.*, **8**, 61—80 (1993).
- (10) San Feliciano, A.; Barrero, A. F.; Del Corral, J. M. M.; Gacimartin, M. V.; Medarde, M. *Phytochemistry*, **21**, 2115—2117 (1982).

- (11) Mikhova, B.; Duddeck, H.; Taskova, R.; Mitova, M.; Alipieva, K. *Z Naturforsch. C*, **59c**, 244—248 (2004).
- (12) Křen, V.; Martínková, L. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 1303—1328 (2001).
- (13) Poduslo, J.; Curran, G. L. *Mol. Brain Res.*, **23**, 157—162 (1994).
- (14) Egleton, R. D.; Mitchell, S. A.; Huber, J. D.; Palian, M. M.; Polt, R.; Davis, T. P. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **299**, 967—972 (2001).
- (15) Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D. *J. Med. Chem.*, **49**, 7559—7583 (2006).
- (16) Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **54**, 355—366 (2002).
- (17) Mbairaroua, O.; Ton-That, T.; Tapiéro, C. *Carbohydr. Res.*, **253**, 79—99 (1994).
- (18) Mastelić, J.; Jerković I.; Vinković, M.; Džolić, Z.; Vikić-Topić, D. *Croat. Chem. Acta.*, **3**, 491—500 (2004).
- (19) Patov, S. V.; Puneov, V. V.; Kuchin, A. V.; Frolova, L. L. *Chem. Nat. Compd.*, **42**, 431—433 (2006).
- (20) Vijayakumar, G. R.; Divakar, S. *Biotechnol Lett.*, **29**, 575—584 (2007).
- (21) Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **50**, 21—123 (1994).
- (22) Rio, S.; Beau, J.-M.; Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.*, **219**, 71—90 (1991).
- (23) Ikeda, T.; Kajimoto, T.; Kondo, H.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2485—2490 (1997).
- (24) Schmidt, R. R.; Junq, K.-H. Trichloroacetimidates. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I: Chemistry of Saccharides*. Ernst, B., Hart, G.W., Sinaÿ, P., Eds.; Wiley-VCH, Weinheim, 2000; Vol. 1, pp 5—59.

- (25) Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6713–6725 (2006).
- (26) Urban, F.; Moore, B. S.; Breitenbach, R. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 4421–4424 (1990).
- (27) Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. *J. Org. Chem.*, **64**, 7265–7266 (1999).
- (28) Schmidt, R. R.; Toepfer, A. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3353–3356 (1991).
- (29) Agrawal, P. K. *Phytochemistry*, **31**, 3307–3330 (1992).
- (30) Flitsch, S. L. *Nature*, **437**, 201–202 (2005).
- (31) Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. *Anal. Biochem.*, **191**, 31–34 (1990).
- (32) Burger, A.; Abraham, D. J. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Vol. 2. 6<sup>th</sup> ed., Wiley, New Jersey, 2003, pp 576–591.
- (33) Ross, A. J.; Ivanova, I. A.; Ferguson, M. A. J.; Nikolaev, A. V. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 72–81 (2001).
- (34) Kitagawa, I.; Baek, N. I.; Ohashi, K.; Sakagami, M.; Yoshikawa, M.; Shibuya, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1131–1133 (1989).

**Table 1.** Synthesis of  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**) by Schmidt's inverse procedure

TCA <sup>a</sup>	R <sup>1</sup>	Yield <sup>b</sup> (%)	R <sup>2</sup>	Yield <sup>b</sup> (%)	$\alpha/\beta$ <sup>c</sup>
	<b>5a</b> Fuc-(OBz) <sub>3</sub>	88	<b>5b</b> Fuc	98	0:1
	<b>6a</b> Rha-(OBz) <sub>3</sub>	95	<b>6b</b> Rha	95	1:0
	<b>7a</b> Xyl-(OBz) <sub>3</sub>	95	<b>7b</b> Xyl	87	0:1
	<b>8a</b> Glc-(OBz) <sub>4</sub>	85	<b>8b</b> Glc	95	0:1
	<b>9a</b> Gal-(OBz) <sub>4</sub>	90	<b>9b</b> Gal	89	0:1
	<b>10a</b> Man-(OBz) <sub>4</sub>	83	<b>10b</b> Man	56	1:0

Fuc:  $\beta$ -D-fucopyranose; Rha:  $\alpha$ -L-rhamnopyranose; Xyl:  $\beta$ -D-xylopyranose; Glc:  $\beta$ -D-glucopyranose; Gal:  $\beta$ -D-galactopyranose; Man:  $\alpha$ -D-mannopyranose; Gly: glycone.

<sup>a</sup> TCA: Trichloroacetimidate donors;

<sup>b</sup> Isolated yield;

<sup>c</sup> The configuration of the glycosidic linkage was determined by <sup>1</sup>H NMR analysis.

**Table 2.** *In vitro* cytotoxicity of  $\alpha$ -bisabolol glycosides (**5b-10b**) measured by Hoechst assay

Cpd	Panel cell lines / IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>										
	A549	DLD-1	MCF-7	MEL-2	PA-1	PANC	PC-3	U-251	U-87	GL-261	WS1
<b>1</b>	80 ± 9	117 ± 7	106 ± 9	140 ± 12	93 ± 10	>150	>150	>150	130 ± 15	114 ± 6	>150
<b>5b</b>	61 ± 6	96 ± 8	75 ± 2	92 ± 8	64 ± 7	109 ± 6	98 ± 9	107 ± 6	84 ± 9	90 ± 7	87 ± 3
<b>6b</b>	40 ± 4	61 ± 4	45 ± 4	62 ± 4	40 ± 3	64 ± 5	58 ± 4	58 ± 4	46 ± 4	54 ± 3	64 ± 4
<b>7b</b>	63 ± 3	98 ± 8	61 ± 3	100 ± 2	52 ± 4	99 ± 6	89 ± 8	112 ± 5	83 ± 9	82 ± 6	93 ± 3
<b>8b</b>	94 ± 6	112 ± 5	88 ± 2	>150	81 ± 10	99 ± 4	128 ± 7	>150	96 ± 13	123 ± 9	109 ± 8
<b>9b</b>	111 ± 14	>150	>150	>150	118 ± 15	>150	>150	>150	>150	>150	>150
<b>10b</b>	53 ± 4	79 ± 7	45 ± 1	81 ± 5	49 ± 4	74 ± 3	72 ± 1	92 ± 7	68 ± 7	44 ± 1	88 ± 4
<b>Etoposide</b>	<0.01	<0.01	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.1	<0.01	3 ± 2	0.9 ± 0.3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup> Data represent mean values ± standard deviation for two independent experiments made in triplicate.

**Table 3.** *In silico* prediction of  $\alpha$ -bisabolol glycosides parameters involved in BBB

Cpd	Sugar	penetration			PSA (Å) <sup>d</sup>
		MW (g/mol) <sup>a</sup>	HBD <sup>b</sup>	clog <i>P</i> <sup>c</sup>	
<b>1</b>	-	222.4	1	4.3	19.3
<b>5b</b>	Fuc	368.3	3	3.2	70.3
<b>6b</b>	Rha	368.3	3	2.8	74.8
<b>7b</b>	Xyl	354.5	3	2.7	74.6
<b>8b</b>	Glc	384.5	4	2.2	93.6
<b>9b</b>	Gal	384.5	4	2.1	93.4
<b>10b</b>	Man	384.5	4	2.1	96.6
Suggested limits <sup>15</sup>		<500	<3	2-5	<90

<sup>a</sup> Molecular weight;

<sup>b</sup> Hydrogen bond donor;

<sup>c</sup> Calculated partition coefficient;

<sup>d</sup> Polar surface area.

**Table 4.**  $^{13}\text{C}$  NMR data [100 MHz,  $\delta$  (ppm)] for compounds **5a-10a** in  $\text{CDCl}_3$ 

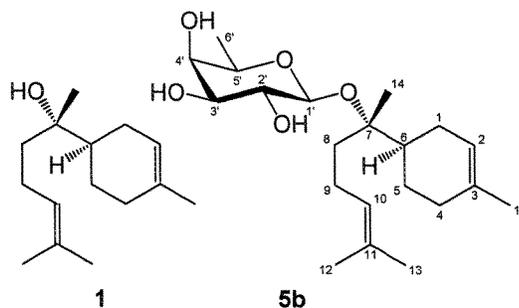
C no.	<b>5a</b>	<b>6a</b>	<b>7a</b>	<b>8a</b>	<b>9a</b>	<b>10a</b>
1	26.7	26.8	26.5	26.6	26.6	26.9
2	120.2	120.7	120.4	120.2	120.3	120.5
3	134.4	134.3	134.2	134.2	134.3	134.5
4	30.8	31.3	30.9	30.8	30.8	31.2
5	22.8	23.9	23.1	23.1	23.0	23.8
6	40.5	40.9	40.7	40.1	40.8	40.9
7	82.3	82.6	82.4	82.7	82.7	82.9
8	38.3	37.4	38.2	38.3	38.4	36.4
9	21.7	22.4	22.4	21.7	21.8	22.2
10	124.9	124.5	124.7	124.6	124.7	124.2
11	131.3	131.7	131.5	131.4	131.4	132.0
12	18.0	17.9	17.8	17.8	17.9	17.8
13	25.9	25.5	25.9	25.7	25.8	25.8
14	19.9	20.4	20.1	19.7	19.7	21.1
15	23.5	23.5	23.5	23.3	23.4	23.5
1'	95.8	91.8	95.2	96.0	96.3	91.8
2'	70.1	72.4	71.4	72.3	70.1	72.4
3'	72.5	70.4	71.6	73.4	72.1	70.4
4'	71.4	72.2	70.0	70.2	68.5	67.3
5'	69.6	67.1	61.8	72.1	71.3	69.3
6'	16.6	17.8		63.8	62.6	63.5
C-Ar	128.4- 130.2 133.1- 133.5	128.4- 130.0 133.2- 133.5	128.4- 130.0 133.2- 133.5	128.4- 129.9 133.1- 133.5	128.4- 130.2 133.2- 133.6	128.4- 130.1 133.1- 133.5
C=O	165.4 165.9 166.3	165.8 165.9 166.0	165.2 165.7 165.8	165.1 165.4 166.0 166.2	165.3 165.7 165.8 166.2	165.7 165.7 165.8 166.4

**Table 5.**  $^{13}\text{C}$  NMR data [100 MHz,  $\delta$  (ppm)] for compounds **5b-10b**

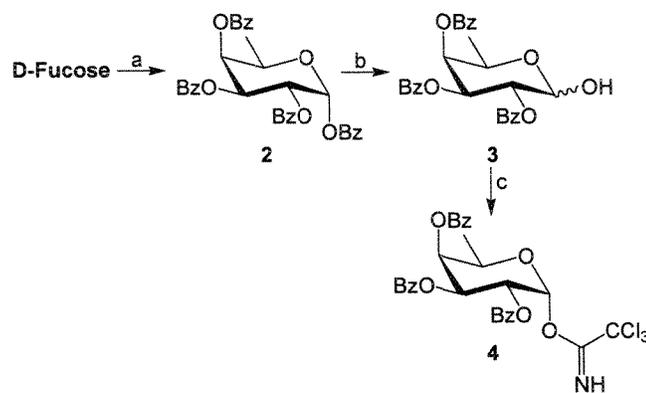
C no.	<b>5b</b> <sup>a</sup>	<b>6b</b> <sup>b</sup>	<b>7b</b> <sup>c</sup>	<b>8b</b> <sup>b</sup>	<b>9b</b> <sup>b</sup>	<b>10b</b> <sup>a</sup>
1	27.0	27.1	27.3	27.8	27.8	26.7
2	120.6	121.7	121.2	121.7	121.8	120.6
3	134.5	134.9	134.7	135.0	134.9	134.3
4	31.1	32.1	31.7	32.1	32.1	32.0
5	23.5	25.0	24.0	24.5	24.5	23.6
6	41.0	42.4	41.8	42.5	42.5	40.7
7	81.8	81.8	82.3	82.5	82.3	81.3
8	37.9	38.3	38.6	39.0	39.0	36.1
9	21.8	23.2	22.5	22.8	22.8	22.8
10	125.0	125.7	125.5	126.3	126.3	124.2
11	131.2	132.1	131.6	131.7	131.6	131.7
12	18.0	17.8	17.8	17.9	17.9	17.8
13	25.8	25.9	25.9	25.9	25.9	25.8
14	20.3	20.6	20.4	20.4	20.5	21.0
15	23.5	23.5	23.6	23.6	23.6	23.5
1'	97.1	95.6	98.4	98.6	99.1	94.0
2'	72.0	72.5	74.4	75.4	72.9	72.8
3'	74.4	74.1	77.3	78.4	75.3	72.0
4'	71.9	73.8	70.6	71.7	69.9	66.6
5'	70.4	70.1	66.0	77.4	76.0	72.5
6'	16.7	18.0		63.0	62.0	61.1

<sup>a</sup> In  $\text{CDCl}_3$ .<sup>b</sup> In MeOD.<sup>c</sup> In  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1.

**Figure and Scheme Captions.**

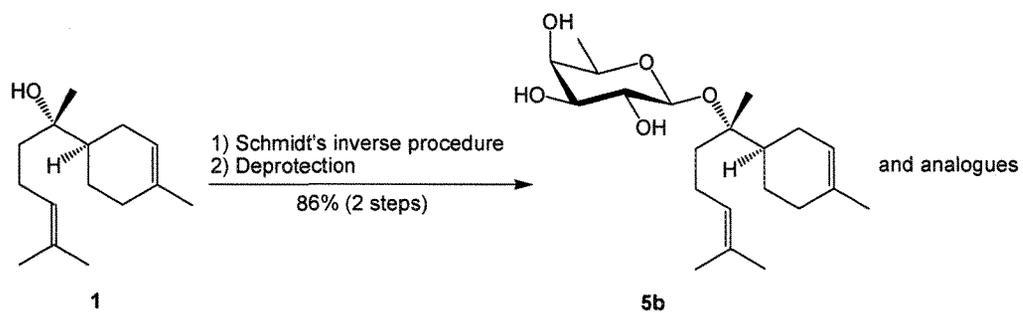


**Figure 1.** Chemical structures of  $\alpha$ -(-)-bisabolol (**1**) and  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside (**5b**).



**Scheme 1.** Synthesis of 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-fucopyranosyl trichloroacetimidate (**4**).

Reagents and conditions: (a) BzCl (6.0 equiv), DMAP (0.1 equiv), py, 0° to rt, overnight, 94%; (b) i-HBr/HOAc 33%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2 h; ii-Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.35 equiv), acetone/H<sub>2</sub>O 20:1, rt, 1 h, 85% (2 steps); (c) CCl<sub>3</sub>CN (6.0 equiv); Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.2 equiv); CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 h, 71%.

**Synopsis Graphic.**

## CHAPITRE 7

### ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

#### 7.1. Criblage biologique des huiles essentielles de plantes de la flore laurentienne

Au cours de ce projet de maîtrise, plusieurs huiles essentielles de différentes plantes de la forêt boréale et plus généralement de la flore laurentienne ont été sélectionnées pour effectuer le criblage biologique. La sélection des plantes a été réalisée en fonction de divers critères dont le principal est l'usage en médecine traditionnelle [Marles *et al.*, 2000; Moerman, 1998, Bergeron *et al.*, 1996] accordé à la plante. Un autre critère important est la méconnaissance de l'activité biologique et/ou de la composition chimique de l'huile essentielle de la plante.

La plupart des huiles essentielles utilisées pour ce criblage proviennent d'une compagnie productrice d'huiles essentielles, Aliksir<sup>2</sup>, basée à Grondines dans la région de Québec. Cette compagnie travaille en collaboration avec la corporation LASEVE<sup>3</sup> de l'Université du Québec à Chicoutimi ce qui certifie de la bonne qualité de leurs huiles essentielles. Les plantes sélectionnées sont répertoriées dans le tableau 5 de la page suivante. La provenance de l'huile essentielle ainsi que la partie de la plante utilisée sont également indiquées.

---

<sup>2</sup> [www.aliksir.com](http://www.aliksir.com)

<sup>3</sup> <http://corpolaseve.uqac.ca/Fr/>

**Tableau 5.** Plantes sélectionnées pour le criblage biologique

<b>Espèces</b>	<b>Nom français</b>	<b>Partie de la plante utilisée</b>
<i>Asarum canadense</i> <sup>a</sup>	Asaret du Canada	Racines
<i>Juniperus communis</i> <sup>a</sup>	Genévrier commun	Rameaux, baies
<i>Daucus carota</i> <sup>a</sup>	Carotte sauvage	Graines
<i>Monarda didyma</i> <sup>a</sup>	Monarde didyma	Tiges et fleurs
<i>Monarda fistulosa</i> <sup>a</sup>	Monarde fistuleuse	Tiges et fleurs
<i>Populus balsamifera</i> <sup>a</sup>	Peuplier baumier	Bourgeons
<i>Tanacetum vulgare</i> <sup>a</sup>	Tanaisie vulgaire	Tiges et fleurs
<i>Ledum groenlandicum</i> <sup>a</sup>	Thé du labrador	Feuilles
<i>Solidago canadensis</i> <sup>a</sup>	Verge d'or	Tiges et fleurs
<i>Solidago puberula</i> <sup>a</sup>	Verge d'or pubérulante	Tiges et fleurs
<i>Coniza canadensis</i> <sup>a</sup>	Vergerette du Canada	Tiges et fleurs
<i>Artemisia vulgaris</i> <sup>b</sup>	Armoise vulgaire	Tiges et fleurs
<i>Achillea millefolium</i> <sup>b</sup>	Achillée millefeuille	Tiges et fleurs
<i>Echinacea purpur</i> <sup>a</sup>	Échinacée pourpre	Tiges et fleurs
<i>Acorus calamus</i> <sup>a</sup>	Acore roseau	Rhizomes
<i>Tsuga canadensis</i> <sup>a</sup>	Pruche	Rameaux; aiguilles
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>a</sup>	Millepertuis	Tiges et fleurs

<sup>a</sup> : huile essentielle en provenance de la compagnie Aliksir

<sup>b</sup> : Huile essentielle obtenue au laboratoire LASEVE

### 7.1.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID)

L'analyse chimique des huiles essentielles est effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse *Agilent 6890N* équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur automatique *Agilent 7683*. Les constituants des huiles essentielles sont séparés simultanément sur une colonne capillaire polaire (Supelcowax 10) et une apolaire (DB-5) (longueur: 30 m ; diamètre interne: 0,25 mm; épaisseur du film: 0,25 µm). Les conditions opératoires sont: 260 °C pour la température de l'injecteur split et 250 °C pour la température du détecteur FID. La

programmation de température pour l'analyse des huiles essentielles est : 40 °C (pendant 2 min) puis montée à 210 °C à raison de 2 °C/min et maintien constant à 210 °C pendant 30 min.

### **7.1.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (GC-MS)**

Le spectromètre de masse, *Hewlett-Packard 5972* à quadripôle, est couplé à un chromatographe en phase gazeuse *Hewlett-Packard 6890*. La colonne utilisée est une colonne apolaire (DB-5) identique à celle mentionnée ci-dessus. Les conditions opératoires sont telles qu'indiquées ci-dessus.

### **7.1.3. Identification des composés**

L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs indices de rétention selon Kovats [Kovats, 1965] sur les deux types de colonne, en comparaison avec la littérature [Adams, 2001; Adams 2003]. Une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée [Adams, 2001; Adams 2007]. Les compositions chimiques des huiles essentielles des plantes sélectionnées sont répertoriées à l'annexe 1.

### **7.1.4. Tests biologiques**

Les huiles essentielles des plantes sélectionnées ont été testées pour leurs activités anticancéreuse, antioxydante, antifongique et antibactérienne.

L'activité anticancéreuse est évaluée à l'aide du test de réduction de la résazurine en résorufine [O'Brien *et al.*, 2000]. La résazurine non fluorescente est réduite par le métabolisme mitochondrial des cellules en une molécule fluorescente, la résorufine. L'inhibition de la croissance cellulaire peut ainsi être mesurée. Pour corroborer les résultats obtenus à l'aide de ce premier test, une autre mesure est effectuée en quantifiant l'ADN cellulaire. Cette méthode est appelée test de Hoechst [Rago *et al.*, 1990]. Les résultats sont exprimés en  $IC_{50}$ , c'est-à-dire la concentration (en  $\mu\text{g/mL}$ ) qui inhibe 50% de la croissance cellulaire. Le potentiel anticancéreux des huiles essentielles a été évalué sur trois lignées cellulaires: A549 correspond au carcinome de poumon, DLD-1 correspond à l'adénocarcinome de côlon et WS1 correspond aux fibroblastes humains. Cette dernière lignée, non cancéreuse, permet d'évaluer la toxicité des huiles essentielles envers les cellules saines. L'étoposide est utilisé comme témoin positif.

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée à l'aide du test chimique ORAC («*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*») [Ou *et al.*, 2001]. Ce test, réalisé avec un spectrofluorimètre, consiste en une mesure de la dégradation (oxydation) de la fluorescéine induite par un stress oxydatif (décomposition thermique (37°C) de l'AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride en deux radicaux libres). L'éventuelle présence de composés antioxydants dans l'huile essentielle en retarde la dégradation. La réaction est standardisée par rapport à des concentrations connues de Trolox, un composé reconnu pour son activité antioxydante. Ce composé est la section hydrophile de la vitamine E (tocophérol). Les résultats sont exprimés en équivalent de Trolox par milligramme d'huile essentielle ( $\mu\text{mol Trolox/mg}$ ). L'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme témoins positifs.

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée sur l'espèce de levure *Candida albicans* suspendu dans un milieu nutritif de Saboraud dextrose. La levure *Candida albicans* est responsable chez l'homme de nombreuses infections fongiques notamment au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques [He *et al.*, 2007]. Les levures sont incubées pendant huit heures à 37°C en présence ou en absence d'huile essentielle. La prolifération cellulaire est ensuite quantifiée à l'aide de la résazurine [To *et al.*, 1995] et le pourcentage de survie est calculé pour chacune des concentrations testées. L'amphotéricin B est utilisé comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub> (µg/mL).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée sur deux bactéries: *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif). Les *S. aureus* et *E. coli* sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux (infections nosocomiales) [Branger, 2005; Fritsche *et al.*, 2005]. L'activité contre la croissance des bactéries est évaluée de la même manière que pour le test antifongique, c'est-à-dire en incubant les bactéries dans un milieu nutritif à 37 °C en présence ou en absence de l'huile essentielle. Le test à la résazurine est ensuite utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire [To *et al.*, 1995]. Le chloramphénicol est utilisé comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub> (µg/mL).

#### **7.1.5. Résultats des tests d'activités**

##### **7.1.5.1. Activité anticancéreuse**

Le tableau suivant présente les résultats obtenus pour l'activité anticancéreuse des huiles essentielles sélectionnées.

**Tableau 6.** Activité anticancéreuse des huiles essentielles

Huile essentielle	IC <sub>50</sub> ± SD (µg/mL)					
	Résazurine			Hoechst		
	A549	DLD-1	WS1	A549	DLD-1	WS1
<i>Asarum canadense</i>	> 200	> 200	> 200	38 ± 17	40 ± 39	63 ± 16
<i>Juniperus communis</i>	24 ± 1	31 ± 8	18 ± 1	19,2 ± 0,8	26 ± 2	20 ± 1
<i>Daucus carota</i>	34 ± 2	36 ± 3	33 ± 4	31,3 ± 0,8	32 ± 3	35 ± 2
<i>Monarda didyma</i>	72 ± 3	68 ± 4	58 ± 7	48 ± 3	49 ± 5	49 ± 4
<i>Monarda fistulosa</i>	> 200	> 200	128 ± 38	38 ± 4	40 ± 5	80 ± 12
<i>Populus balsamifera</i>	25 ± 2	28 ± 1	22,1 ± 0,9	16,0 ± 0,8	12 ± 2	18 ± 1
<i>Tanacetum vulgare</i>	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	194 ± 32
<i>Ledum groenlandicum</i>	40 ± 3	41 ± 4	32 ± 2	26 ± 2	31 ± 2	31 ± 3
<i>Solidago canadensis</i>	37 ± 2	38 ± 2	33 ± 5	30 ± 1	33 ± 3	33 ± 2
<i>Solidago puberula</i>	34 ± 1	40 ± 8	32 ± 6	25,2 ± 0,7	19 ± 3	30 ± 2
<i>Coniza canadensis</i>	47 ± 2	49 ± 5	37 ± 3	28 ± 2	25 ± 1	27 ± 1
<i>Echinacea purpura</i>	27 ± 2	27 ± 3	31 ± 12	20 ± 2	25 ± 2	33 ± 4
<i>Acorus calamus</i>	45 ± 3	37 ± 2	43 ± 2	25 ± 1	29 ± 2	38 ± 5
<i>Tsuga canadensis</i>	36 ± 2	36 ± 2	31 ± 9	37 ± 4	34 ± 3	39 ± 6
<i>Hypericum perforatum</i>	18 ± 2	29 ± 5	18 ± 1	18 ± 2	24 ± 1	23 ± 3
<i>Artemisia vulgaris</i>	42 ± 2	87 ± 2	42 ± 2	40 ± 4	54 ± 2	43 ± 3
<i>Achillea millefolium</i>	61 ± 5	> 200	46 ± 29	41 ± 3	49,6 ± 0,9	41 ± 1
Étoposide	3,1 ± 0,3	31 ± 7	33 ± 8	5 ± 1	5 ± 2	> 50

À l'étude de ces résultats, il apparaît que la majorité des huiles essentielles sont cytotoxiques mise à part celle de *Tanacetum vulgare*. En effet, selon les critères du NCI (*National Cancer Institute*), pour un extrait, une valeur d'IC<sub>50</sub> comprise entre 100 et 50 µg/mL est considérée comme faiblement active et modérément active s'il elle est comprise entre 49 et 10 µg/mL [Boyd, 1997]. Ainsi, l'huile essentielle de *Populus balsamifera* retient particulièrement l'attention (IC<sub>50</sub> de 12 ± 2 µg/mL sur DLD-1 selon le test de Hoechst), ainsi que celle de *Solidago puberula* (IC<sub>50</sub> de 19 ± 3 µg/mL sur DLD-1 selon le test de Hoechst). Concernant l'activité anticancéreuse, seules ces deux huiles ont été étudiées intensivement au cours de ce projet de maîtrise. Cependant, beaucoup

d'autres huiles mériteraient des investigations plus poussées notamment celles d'*Hypericum perforatum* (IC<sub>50</sub> de 18 ± 2 µg/mL sur A549 selon les deux tests) et *Juniperus communis* (IC<sub>50</sub> de 19,2 ± 0,8 µg/mL sur A549 selon le test de Hoechst). L'activité anticancéreuse de ces deux huiles essentielles n'a jamais été reportée dans la littérature scientifique à ce jour. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur ces deux huiles.

### 7.1.5.2. Activité antifongique

Les résultats pour l'activité antifongique des huiles essentielles sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 7.** Activité antifongique des huiles essentielles

Huile essentielle	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <i>C. albicans</i>
<i>Asarum canadense</i>	> 200
<i>Juniperus communis</i>	74 ± 6
<i>Daucus carota</i>	> 200
<i>Monarda didyma</i>	65 ± 5
<i>Monarda fistulosa</i>	58 ± 6
<i>Populus balsamifera</i>	> 200
<i>Tanacetum vulgare</i>	> 200
<i>Ledum groenlandicum</i>	> 200
<i>Solidago canadensis</i>	> 200
<i>Solidago puberula</i>	> 200
<i>Coniza canadensis</i>	> 200
<i>Echinacea purpura</i>	> 200
<i>Acorus calamus</i>	> 200
<i>Tsuga canadensis</i>	> 200
<i>Hypericum perforatum</i>	> 200
<i>Artemisia vulgaris</i>	> 200
<i>Achillea millefolium</i>	nd
Amphotericin B	0,67 ± 0,07

La majorité des huiles essentielles ne sont pas actives contre la prolifération de *Candida albicans* puisque la valeur d'IC<sub>50</sub> est supérieure à 200 µg/mL. Seules les deux espèces de *Monarda* se distinguent des autres huiles essentielles avec une IC<sub>50</sub> modérée de 65 ± 5 µg/mL pour la *M. didyma* et 58 ± 6 µg/mL pour la *M. fistulosa*. L'huile essentielle de *Juniperus communis* est également modérément active (IC<sub>50</sub> de 74 ± 6 µg/mL).

### 7.1.5.3. Activité antibactérienne

Les résultats pour l'activité antibactérienne des huiles essentielles sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 8.** Activité antibactérienne des huiles essentielles

Huile essentielle	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Asarum canadense</i>	> 160	> 160
<i>Juniperus communis</i>	140 ± 57	> 160
<i>Daucus carota</i>	> 160	> 160
<i>Monarda didyma</i>	> 160	105 ± 4
<i>Monarda fistulosa</i>	> 160	> 160
<i>Populus balsamifera</i>	> 160	> 160
<i>Tanacetum vulgare</i>	> 160	> 160
<i>Ledum groenlandicum</i>	> 160	> 160
<i>Solidago canadensis</i>	> 160	> 160
<i>Solidago puberula</i>	> 160	> 160
<i>Coniza canadensis</i>	> 160	> 160
<i>Echinacea purpura</i>	> 160	> 160
<i>Acorus calamus</i>	> 160	> 160
<i>Tsuga canadensis</i>	> 160	> 160
<i>Hypericum perforatum</i>	> 160	> 160
<i>Artemisia vulgaris</i>	> 160	> 160
<i>Achillea millefolium</i>	> 160	> 160
Chloramphénicol	7 ± 1	0,9 ± 0,1

Aucune des huiles essentielles n'a montré une activité antibactérienne marquée contre les deux types de bactéries *S. aureus* et *E. coli*. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus sont, en effet, toutes supérieures à 150 µg/mL à l'exception de l'huile essentielle de *Monarda didyma* (IC<sub>50</sub> 105 ± 4 µg/mL sur *E. coli*).

#### 7.1.5.4. Activité antioxydante

Les résultats du test ORAC pour l'activité antioxydante des huiles essentielles sont présentés dans le tableau suivant. Les résultats sont comparés à l'indice ORAC obtenu pour un extrait de bleuets [Roy *et al.*, 2002] car ce fruit est bien connu pour son fort pouvoir antioxydant.

**Tableau 9.** Activité antioxydante des huiles essentielles

Huile essentielle	Indice ORAC (µmol Trolox/mg)
<i>Asarum canadense</i>	0,02 ± 0,01
<i>Juniperus communis</i>	0,30 ± 0,02
<i>Daucus carota</i>	0,41 ± 0,02
<i>Monarda didyma</i>	10,20 ± 0,20
<i>Monarda fistulosa</i>	15,00 ± 3,00
<i>Populus balsamifera</i>	0,79 ± 0,01
<i>Tanacetum vulgare</i>	1,30 ± 0,07
<i>Ledum groenlandicum</i>	0,72 ± 0,03
<i>Solidago canadensis</i>	0,42 ± 0,05
<i>Solidago puberula</i>	1,10 ± 0,10
<i>Coniza canadensis</i>	0,65 ± 0,03
<i>Echinacea purpura</i>	0,90 ± 0,40
<i>Acorus calamus</i>	0,80 ± 0,02
<i>Tsuga canadensis</i>	0,30 ± 0,04
<i>Hypericum perforatum</i>	0,50 ± 0,06
<i>Artemisia vulgaris</i>	0,80 ± 0,10
<i>Achillea millefolium</i>	0,17 ± 0,02
Acide gallique	6,30 ± 0,30
Quercétine	13,00 ± 4,00
Extrait de bleuets	0,42 ± 0,02*

\*[Roy *et al.*, 2002]

En comparant les résultats obtenus pour les huiles essentielles à l'indice ORAC de l'extrait de bleuets, il apparaît que les huiles essentielles sont toutes actives mise à part celle d'*Asarum canadense* ( $0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ). Deux huiles essentielles se distinguent particulièrement : il s'agit des deux espèces de monardes, *M. didyma* ( $10,2 \pm 0,2 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ) et *M. fistulosa* ( $15 \pm 3 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ) dont les valeurs de l'indice ORAC avoisinent celle du composé standard très antioxydant, l'acide gallique ( $13 \pm 4 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ).

#### 7.1.5.5. Conclusion

À l'issue de ce criblage biologique, trois huiles essentielles ont été retenues soit pour leur activité biologique soit pour la méconnaissance de leur profil chimique. Ce sont sur ces huiles que portent tous les travaux réalisés au cours de ce projet de maîtrise:

- ***Solidago puberula***: L'huile essentielle obtenue à partir des sommités florales s'est révélée intéressante car la composition chimique de celle-ci n'a jamais été établie. Les résultats d'analyse et d'activité concernant l'huile essentielle et l'hydrolat de cette plante sont présentés dans la section suivante.
  
- ***Populus balsamifera***: L'huile essentielle obtenue à partir des bourgeons s'est révélée très intéressante de part son activité anticancéreuse. De plus, son profil phytochimique n'a pas été établi en détail dans la littérature. Les résultats relatifs à cette huile sont présentés dans ce mémoire sous la forme d'une publication scientifique au chapitre 5. Les résultats concernant la composition et l'activité biologique de l'hydrolat de *Populus balsamifera* sont présentés dans ce chapitre.

- ***Monarda didyma***: L'huile essentielle obtenue à partir des fleurs a montré une activité antioxydante très intéressante. Les résultats relatifs à l'huile essentielle ainsi qu'à l'hydrolat sont présentés dans ce chapitre.

## 7.2. *Solidago puberula*

La verge d'or pubérulante ou *Solidago puberula* (*Asteraceae*) est une plante qui abonde dans les régions montagneuses de tout le nord du Québec et dans la région moyenne des Laurentides jusque dans le voisinage de la ville de Québec. Comme toutes les espèces de verge d'or, la *Solidago puberula* se caractérise par un épi de capitules de fleurs jaunes (Figure 19) [Marie-Victorin, 1999].



Figure 19. Photo et schéma de la *Solidago puberula*

Le genre *Solidago* regroupe un grand nombre d'espèces dont certaines sont bien connues pour leurs propriétés médicinales. Par exemple, *Solidago canadensis* est utilisé pour traiter les inflammations au niveau du système urinaire et traiter les troubles rénaux. En plus de ces propriétés anti-inflammatoires, elle possède également des propriétés antifongique, diurétique et

même anticancéreuse [Marles *et al.*, 2000]. Beaucoup d'études concernant la phytochimie d'espèces de *Solidago* ont été réalisées [Kalembe *et al.*, 2004; Kasali *et al.*, 2002; Kalembe *et al.*, 2001] et plusieurs rapportent des propriétés pharmacologiques intéressantes [Tkachev *et al.*, 2006; Tucker *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2006]. Parmi toutes ces études, aucune ne porte sur l'espèce *Solidago puberula*. La phytochimie de cette plante est par conséquent totalement inconnue.

Puisque ce projet de maîtrise porte principalement sur l'étude des composés volatils des plantes de la forêt boréale, l'accent a été mis sur la composition de l'huile essentielle et de l'hydrolat de la verge d'or pubérulante. Toutefois, des extraits à l'aide d'un extracteur de Soxhlet ont également été réalisés avec divers solvants de différentes polarités. Les résultats de ces analyses sont reportés ci-dessous ainsi que les résultats des tests d'activités les plus pertinents. Seules les sommités florales ont été étudiées au cours de ces travaux.

Les plants entiers avec la racine de *Solidago puberula* ont été récoltés au milieu du mois d'août 2006 dans une pinède au nord du lac Saint-Jean (Saint-Ludger-de-Milot). Un spécimen (N° 499679) a été déposé à l'herbarium Louis-Marie de l'Université de Laval à Québec. Pour obtenir l'huile essentielle et l'hydrolat, les sommités florales ont été sectionnées juste avant de procéder à l'hydrodistillation alors que pour obtenir les extraits aux solvants, les sommités ont été séchées à température ambiante pendant trois jours.

### **7.2.1. Huile essentielle de *Solidago puberula***

#### **7.2.1.1. Extraction**

L'huile essentielle a été obtenue à partir du matériel végétal frais par entraînement à la vapeur d'eau pendant deux heures. Après séchage sur sulfate de magnésium anhydre, 2,20 g d'huile essentielle ont été obtenus ce qui correspond à un rendement de 0,82%. L'huile essentielle de *Solidago puberula* est incolore (indice de réfraction à 20 °C = 1,4795).

### 7.2.1.2. Composition

La composition de l'huile essentielle a été analysée par chromatographie gazeuse selon la méthode précédemment expliquée. Les résultats sont consignés dans le tableau 10. Au total, 24 composés ont été identifiés, ce qui correspond à un pourcentage de 98,42% par rapport à l'ensemble des constituants. L'huile essentielle est composée essentiellement d'hydrocarbures terpéniques dont 79,0% sont des monoterpènes et 18,6% sont des sesquiterpènes.

**Tableau 10.** Composition chimique de l'huile essentielle des sommités florales de *Solidago puberula*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	%
α-pinène	940	1019	9,43 <sup>c</sup>
camphène	953	1064	0,18 <sup>c</sup>
sabinène	976	1122	0,17 <sup>c</sup>
β-pinène	977	1106	0,98 <sup>c</sup>
<b>myrcène</b>	<b>993</b>	<b>1168</b>	<b>53,04<sup>c</sup></b>
α-phellandrène	1001	1163	5,70 <sup>c</sup>
o-cymène	1026	1274	0,14 <sup>c</sup>
limonène	1031	1193	2,81 <sup>c</sup>
cis-β-ocimène	1046	1241	0,55 <sup>c</sup>
trans-β-ocimène	1057	1259	6,03 <sup>c</sup>
acétate de bornyle	1292	1570	0,52 <sup>c</sup>
β-caryophyllène	1415	1579	1,15 <sup>c</sup>
trans-α-bergamotène	1436	1576	0,21 <sup>c</sup>
α-humulène	1453	1651	0,17 <sup>c</sup>
trans-β-farnesène	1461	1667	1,97 <sup>c</sup>
α-amorphène	1483	1685	0,85 <sup>d</sup>
Germacrène D	1483	1694	0,81 <sup>d</sup>
bicyclogermacrène	1498	1745	0,19 <sup>c</sup>
α-zingibérène	1501	1729	1,73 <sup>c</sup>
α-muuroolène	1506	1719	0,13 <sup>c</sup>

$\alpha$ -farnésène	1514	1749	10,74 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -nérolidol	1564	2040	0,46 <sup>c</sup>
$\alpha$ -bisabolol	1684	2201	0,12 <sup>c</sup>
Benzoate de benzyle	1732	1851	0,34 <sup>c</sup>
<b>Total identifié:</b>			<b>98,42</b>

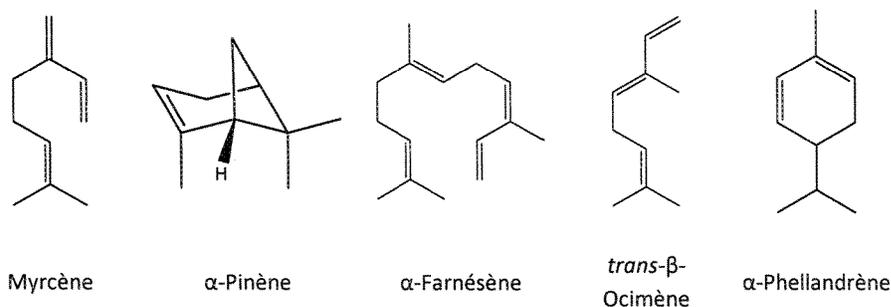
<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne apolaire DB-5.

<sup>d</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne polaire Supelcowax.

Le myrcène apparaît comme le constituant majoritaire de l'huile essentielle (53,0%), suivi de l' $\alpha$ -farnésène (10,7%), de l' $\alpha$ -pinène (9,4%), du *trans*- $\beta$ -ocimène (6,0%) et de l' $\alpha$ -phellandrène (5,7%) (Figure 20). Les huiles essentielles d'espèces de *Solidago* sont habituellement de riches sources de germacrène D [Kalemba *et al.*, 2004]. Ceci n'est pas le cas de la *Solidago puberula* qui ne contient en effet qu'une très faible quantité de ce composé (0,8%).



**Figure 20.** Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Solidago puberula*

Ces résultats ont fait l'objet d'un article scientifique accepté dans *Journal of essential oil research* (Piochon *et al.*, 2008).

L'huile essentielle de *Solidago puberula* en provenance de la compagnie Aliksir (annexe 2) ne présente pas du tout le même profil chimique. Cette huile contient en effet l' $\alpha$ -pinène comme composé majoritaire (25%) suivi du germacrène D (17%), du limonène (12%) puis du myrcène

(10%). Ces différences laissent présager l'existence de polymorphisme chimique pour la *Solidago puberula*. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de cultiver ces plantes au chémotypes différents dans les mêmes conditions environnementales (température, sol, taux d'humidité, altitude, etc.) afin de comparer leur composition [Tkachev *et al.*, 2006].

### 7.2.1.3. Activité anticancéreuse

Le potentiel anticancéreux de l'huile essentielle de *Solidago puberula* a été évalué selon la méthode expliquée précédemment. Les résultats qui ont été obtenus sont présentés dans le tableau 11 suivant et sont comparés à ceux obtenus pour l'huile essentielle de *Solidago puberula* en provenance de la compagnie Aliksir.

**Tableau 11.** Activité anticancéreuse de l'huile essentielle de *Solidago puberula* (HESP)

	Résazurine IC <sub>50</sub> (µg/mL)			Hoechst IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	A549	DLD-1	WS1	A549	DLD-1	WS1
HESP	38 ± 2	30 ± 4	31 ± 13	32 ± 2	32 ± 1	33 ± 3
HESP Aliksir	34 ± 1	40 ± 8	32 ± 6	25,2 ± 0,7	19 ± 3	30 ± 2
Étoposide	3,1 ± 0,3	31 ± 7	33 ± 8	5 ± 1	5 ± 2	> 50

D'après les critères d'activité du NCI exposés précédemment (partie 6.1.5.1), les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus révèlent une activité anticancéreuse modérée pour l'huile essentielle de *Solidago puberula* récoltée dans le nord du Lac Saint-Jean. Ces valeurs sont assez semblables avec celle obtenues pour l'huile essentielle en provenance d'Aliksir, mise à part pour la lignée DLD-1 selon le test de Hoechst (19 ± 3 µg/mL).

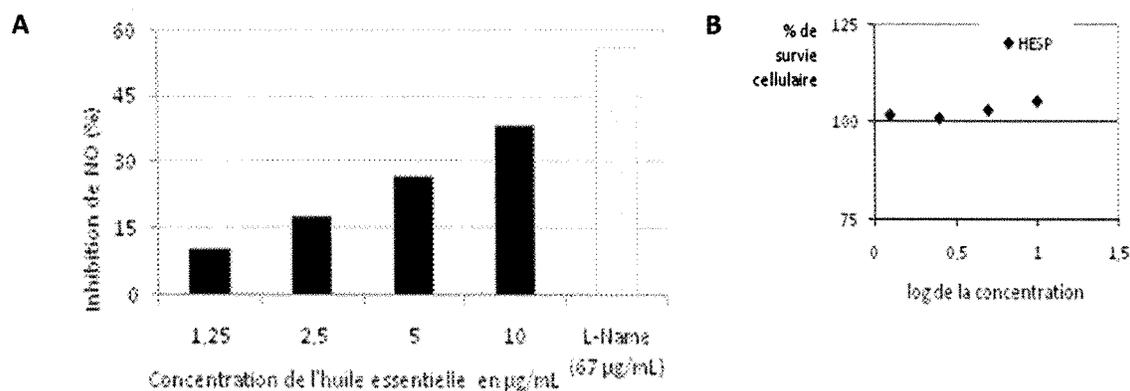
#### 7.2.1.4. Activité anti-inflammatoire

Puisque les espèces du genre *Solidago* sont généralement connues pour contenir des composés actifs contre l'inflammation [Marles *et al.*, 2000; Bruneton, 1999], le potentiel anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Solidago puberula* a également été évalué.

La mesure de l'activité anti-inflammatoire est réalisée en utilisant le lipopolysaccharide (ou LPS), une endotoxine présente dans la paroi des bactéries Gram négatif qui stimule la production de médiateur pro-inflammatoire tel que l'oxyde nitrique (NO) produit par les macrophages lors du processus de la réponse immunitaire. Le test consiste à mesurer *in vitro* la production de NO suite à un stress occasionné par le LPS dans le milieu cellulaire en présence de l'extrait à évaluer. L'activité anti-inflammatoire est évaluée en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages murins (RAW 264.7). Parallèlement, un test de toxicité (résazurine) est effectué afin de s'assurer que la diminution de la production de NO éventuellement observée n'est pas liée à une diminution du nombre de cellules, dans le cas où l'extrait évalué serait toxique. Le test est effectué en incubant les cellules à 37 °C avec des concentrations croissantes de l'extrait. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont stimulées avec 100 µg/mL de LPS. Le surnageant est prélevé 24 heures plus tard et le taux de NO est mesuré en utilisant la réaction de Griess [Green *et al.*, 1990]. L'absorbance est ensuite mesurée à 540 nm et la présence de nitrite est quantifiée par comparaison avec une courbe standard (NaNO<sub>2</sub>).

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle de *Solidago puberula* sont présentés dans la figure suivante (Figure 21). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec le témoin positif, le L-

Name (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester), un composé connu pour son activité anti-inflammatoire.



**Figure 21.** A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'huile essentielle de *Solidago puberula* (HESP)

À l'analyse de la figure ci-dessus, il apparaît qu'une légère inhibition de la production de NO est en relation avec des concentrations croissantes de l'huile essentielle de *Solidago puberula*. D'après le test parallèle à la résazurine, aucune toxicité n'est observée (pourcentage de survie cellulaire d'environ 100% pour chaque concentration). L'huile essentielle exerce une activité anti-inflammatoire modérée.

## 7.2.2. Hydrolat de *Solidago puberula*

### 7.2.2.1. Extraction

À l'issu du processus d'extraction de l'huile essentielle de *Solidago puberula* par entraînement à la vapeur d'eau, 800 mL d'hydrolat ont été récupéré. Pour extraire les composés

volatils, des extractions liquide-liquide successives avec du chloroforme ont été effectuées. Après séchage sur magnésium de sulfate anhydre, filtration puis évaporation du solvant sous pression réduite, 28,1 mg d'hydrolat concentré ont été récupérés ce qui correspond à une concentration de 0,035 mg/mL par rapport au volume de départ. L'hydrolat possède une odeur très forte et il est d'aspect huileux très visqueux.

### 7.2.2.2. Composition

La composition de l'hydrolat a été analysée par GC-MS et GC-FID. Au total, 49 composés ont été identifiés (Tableau 12).

**Tableau 12.** Composition chimique de l'hydrolat de *Solidago puberula*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
acide 2-méthylbutanoïque	854		1,81
<i>cis</i> hex-3-èn-1-ol	862	1384	0,88
hexan-1-ol	877	1359	0,21
butan-1,4-diol	955		0,22
benzaldéhyde	961		0,19
acide hexanoïque	989	1559	0,93
alcool benzylique	1037	1868	5,54
benzène-acétaldéhyde	1046		0,33
acétophénone	1071		0,13
<i>trans</i> -2-octèn-1-ol	1077		0,17
<i>trans</i> -oxyde de linalol	1082	1440	0,36
<i>cis</i> -oxyde de linalol	1099	1471	0,27
linalol	1112	1553	7,28
myrcénol	1115	1607	0,93
maltol	1118	1947	7,07
alcool phényl-éthylque	1121	1914	0,63
<i>cis-p</i> -mentha-2-èn-1-ol	1130	1626	0,82
benzène-acétonitrile	1143		1,21
<i>cis</i> -verbénol	1146	1658	0,72
<i>trans-p</i> -mentha-2-èn-1-ol	1148	2072	0,28
<i>trans</i> -verbénol	1151	1671	2,69
bornéol	1170	1725	0,73
terpin-1-èn-4-ol	1178	1591	1,40
iso-menthol	1181	1619	0,60
para-cymèn-8-ol	1185	1852	1,60

$\alpha$ -terpinéol	1189	1694	6,03
verbénone	1204	1688	0,36
<i>trans</i> -carvéol	1217	1821	0,58
2,3-dihydrobenzofurane	1220	2378	5,07
<i>cis</i> -carvéol	1231	1844	1,44
géraniol	1261	1847	4,08
décénal-2- <i>trans</i>	1266	1648	0,21
décèn-9-ol	1271	1797	0,39
<i>trans</i> -cinnamaldéhyde	1275	2057	0,30
décanol-1	1282	1774	0,58
acétate de bornyle	1293	1570	0,43
carvacrol	1310		0,73
<b>2-méthoxy-4-vinylphénol</b>	<b>1319</b>	<b>2180</b>	<b>18,58</b>
eugénol	1359	2154	0,65
vanilline	1394	2579	0,27
$\alpha$ -humulène	1456	1677	0,91
<i>trans</i> -nérolidol	1565	2040	1,10
germacrène-D-4-ol	1567	2018	0,49
érémoligénol	1620	2170	0,29
$\zeta$ -muurolol	1634	2170	0,23
$\zeta$ -cadinol	1637	2154	0,37
$\beta$ -eudesmol	1652	2209	0,57
$\alpha$ -cadinol	1658		0,25
$\alpha$ -bisabolol	1685	2201	1,00
non identifié A <sup>d</sup>	1897		1,39
non identifié B <sup>e</sup>	2174	2868	4,47
<b>Total identifié:</b>			<b>87,77</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

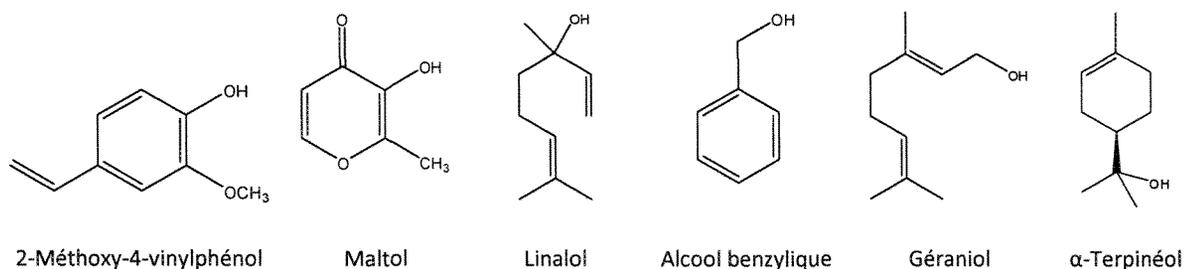
<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne apolaire DB-5.

<sup>d</sup> *m/z* (intensité relative): 112 (100), 79 (70), 139 (47), 59 (45), 43 (27), 252 (26), 114 (21), 97 (15).

<sup>e</sup> *m/z* (intensité relative): 165 (100), 91 (44), 138 (28), 272 (16), 107 (16), 150 (11), 77 (10), 65 (10).

La composition de l'hydrolat est très différente de celle de l'huile essentielle correspondante. Il y a en effet bien moins de composés terpéniques (31% contre 98% dans l'huile essentielle) lesquels sont essentiellement des dérivés oxygénés de mono- ou sesquiterpènes. Les composés de la famille des phénols et des phénylpropanes sont abondants (26%) dans l'hydrolat alors qu'ils sont absents dans l'huile essentielle. Le composé majoritaire est le 2-méthoxy-4-vinylphénol [Buttery *et al.*, 1994] (18,6%), suivi du linalol (7,2%), du maltol (7,1%) et de l' $\alpha$ -terpinéol (6,0%) (Figure 22). Certains composés de l'huile essentielle se retrouvent dans l'hydrolat

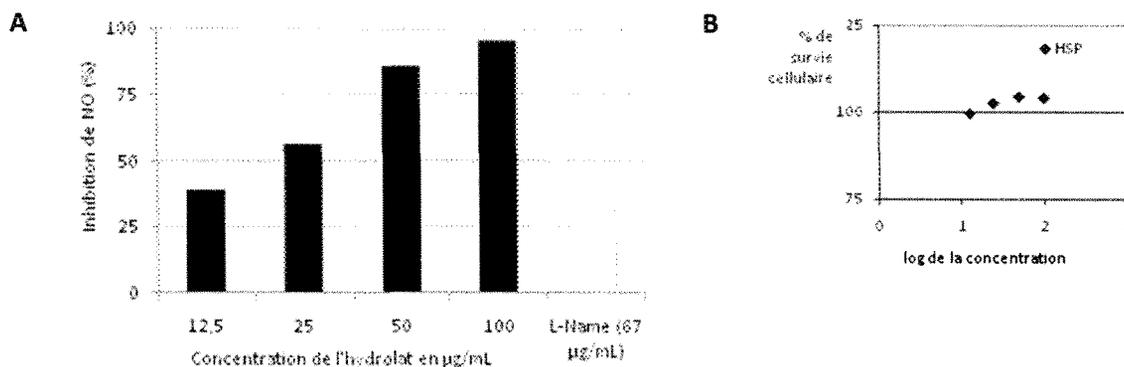
comme l'acétate de bornyle (0,43% contre 0,52% dans l'huile), l' $\alpha$ -humulène (0,9% contre 0,2%), le *trans*-nérolidol (1,1% contre 0,5%) et l' $\alpha$ -bisabolol (1,0% contre 0,1%). D'autres composés sont des dérivés oxygénés de terpènes présents dans l'huile essentielle: le myrcénol (0,9%) par exemple, ainsi que le germacrène D-4-ol (0,5%).



**Figure 22.** Structure des composés majoritaires de l'hydrolat de *Solidago puberula*

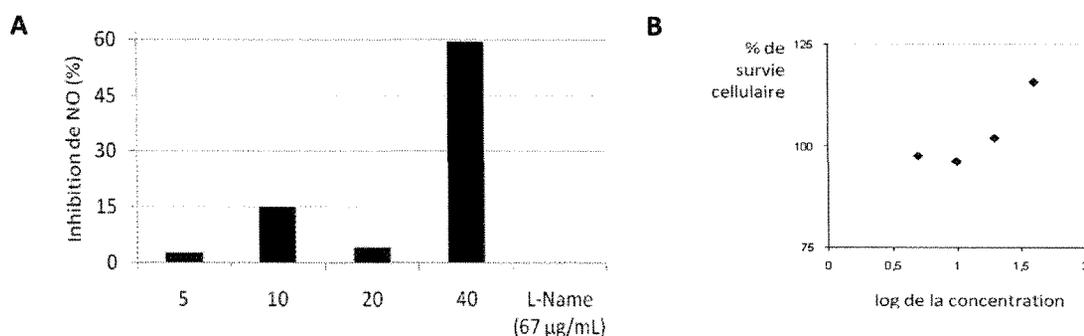
### 7.2.2.3. Activité anti-inflammatoire

L'hydrolat de *Solidago puberula* a été testé pour son activité anti-inflammatoire de la même manière qu'expliquée précédemment. Les résultats sont présentés à la figure suivante:



**Figure 23.** A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité de l'hydrolat de *Solidago puberula* (HSP)

Contrairement à l'huile essentielle, l'hydrolat de *Solidago puberula* exerce une activité anti-inflammatoire nettement plus marquée. À la concentration de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , l'hydrolat est plus actif que le standard L-Name à la concentration de 67  $\mu\text{g/mL}$ . La plus forte activité est observée à 100  $\mu\text{g/mL}$ , concentration à laquelle une inhibition de 96% de la production de NO est observée. De plus, d'après le test de toxicité à la résazurine, aucune mort cellulaire n'est observée (taux de survie de 100%). L'hydrolat de *Solidago puberula* mériterait donc des investigations biologiques supplémentaires. Le composé majoritaire de l'hydrolat, le 2-méthoxy-4-vinylphénol a également été testé pour son activité anti-inflammatoire (Figure 24).



**Figure 24.** A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité du 2-méthoxy-4-vinylphénol

Le 2-méthoxy-4-vinylphénol a exercé une activité anti-inflammatoire inférieure à l'hydrolat mais tout de même intéressante en particulier à la concentration de 40  $\mu\text{g/mL}$  avec un taux d'inhibition de 60% et un pourcentage de survie cellulaire supérieur à 100% à cette concentration. Ce composé est partiellement responsable de l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat.

### 7.2.3. Extraits aux solvants de *Solidago puberula*

#### 7.2.3.1. Extraction

Les sommités florales de *Solidago puberula* séchées (m = 86,1 g) ont été extraites à l'aide d'un extracteur de Soxhlet pendant 24 heures pour chaque solvant. Trois solvants ont été utilisés de manière séquentielle: l'hexane, le dichlorométhane puis le méthanol. Après évaporation du solvant, les extraits sont conservés à 4 °C. Les résultats des extractions sont consignés dans le tableau suivant:

**Tableau 13.** Données d'extraction aux solvants des fleurs de *Solidago puberula*

N° Extrait	Solvant	masse (g)	Rendement (%)
1	Hexane	1,04	1,2
2	Dichlorométhane	0,83	1,0
3	Méthanol	19,02	22,0

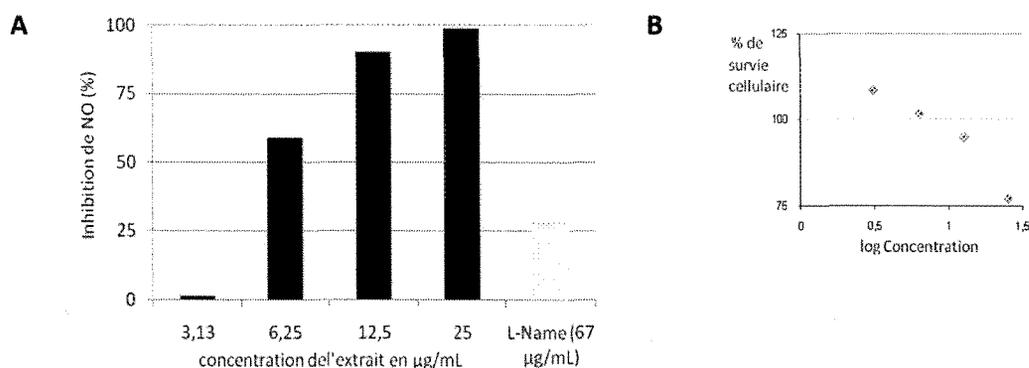
#### 7.2.3.2. Activités anticancéreuse et anti-inflammatoire

Les trois extraits ont été testés afin d'évaluer leurs activités biologiques. Contrairement aux extraits à l'hexane et au méthanol, l'extrait au dichlorométhane (2) a montré une activité anticancéreuse (Tableau 14) et anti-inflammatoire (Figure 25) très intéressante.

**Tableau 14.** Activité anticancéreuse des extraits de *Solidago puberula*

N° extrait	Solvant	Résazurine (IC <sub>50</sub> en µg/mL)			Hoechst (IC <sub>50</sub> en µg/mL)		
		A549	DLD-1	WS1	A549	DLD-1	WS1
1	Hexane	> 200	> 200	> 200	166 ± 15	> 200	145 ± 10
2	Dichlorométhane	38 ± 2	36 ± 6	33 ± 2	21,5 ± 0,7	26 ± 1	25 ± 2
3	Méthanol	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
-	Étoposide	3,1 ± 0,3	31 ± 7	33 ± 8	5 ± 1	5 ± 2	> 50

D'après ces résultats, il serait particulièrement intéressant d'entreprendre des recherches d'isolement et d'identification des constituants de l'extrait au dichlorométhane (**2**) et déterminer les composés responsables de l'activité anticancéreuse globale de l'extrait ( $IC_{50} 21,5 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$  contre A-549).



**Figure 25. A)** Activité anti-inflammatoire et **B)** toxicité de l'extrait au dichlorométhane (**2**) de *Solidago puberula*

En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, l'extrait au dichlorométhane exerce une bonne activité notamment à partir de la concentration de 12,5 µg/mL avec un taux d'inhibition de 90,2%. À la concentration de 25 µg/mL, la production de NO est totalement inhibée, cependant une toxicité est associée à cette concentration (pourcentage de survie: 77%). L'extrait au dichlorométhane mériterait donc une étude phytochimique afin de déceler les composés responsables de cette activité. Diverses études ont été menées sur plusieurs espèces du genre *Solidago* [El-Ghazaly *et al.*, 1992; Leuschner, 1995; Marles *et al.*, 2000] et certaines ont mis en évidence des composés ayant une activité anti-inflammatoire, tel que le leiocarposide, un acide-phénol isolé à partir de la *Solidago virgaurea* L. [Bruneton, 1999].

### 7.3. Hydrolat de *Populus basamifera*

Lors de l'extraction par entraînement à la vapeur de l'huile essentielle de bourgeons de *Populus balsamifera* récolté au printemps (chapitre 5), un volume de 1125 mL d'hydrolat a été obtenu. Cet hydrolat est incolore et possède une odeur forte mais très différente de celle de l'huile essentielle.

#### 7.3.1. Extraction

L'hydrolat a été extrait par fraction de 500 mL avec 3 fois 125 mL de chloroforme. Les phases organiques réunies ont été séchées sur magnésium de sulfate anhydre, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Un résidu huileux jaune-rouille est obtenu. La masse de ce résidu est 255 mg ce qui correspond à une concentration de 0,24 mg/mL par rapport au volume de départ.

#### 7.3.2. Composition

La composition de l'hydrolat a été analysée par GC-MS et GC-FID. Au total, 26 composés ont été identifiés (Tableau 15).

**Tableau 15.** Composition de l'hydrolat de bourgeons de printemps de *Populus balsamifera*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	%
acide isovalérique	859	1687	0,81
acide 2-méthylbutanoïque	868		0,31 <sup>c</sup>
Benzaldehyde	961	1524	0,17
2-méthyl-2-buténoïque acide	964	1859	5,02
1,8-cinéole	1034	1202	2,60
<b>alcool benzylique</b>	<b>1043</b>	<b>1875</b>	<b>32,65</b>
Salicyaldehyde	1045	1672	0,64

Acétophénone	1072	1642	1,46
oxyde de cis linalol	1083	1444	0,14
oxyde de trans linalol	1101		0,17 <sup>c</sup>
Linalol	1113	1557	0,83
alcool phényléthylque	1121	1908	1,84
acétate benzylque	1168	1730	0,85
acide benzoïque	1177	2521	1,11
terpin-1-én-4-ol	1179	1594	0,77
α-terpinéol	1190	1699	2,53
2,3-dihydrobenzofurane	1221	2383	3,52
3-phenyl-2-butanone	1246	1850	4,53
non identifié A <sup>e</sup>	1262	1816	0,77
alcool <i>trans</i> -cinnamique	1311	2273	4,49
méthyl- <i>O</i> -anisate	1344	2627	1,70
acide cinnamique	1452		10,17 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -nérolidol	1566	2045	0,58
τ-cadinol	1638	2160	0,40 <sup>d</sup>
τ-muurolol	1638	2172	0,20 <sup>d</sup>
α-bisabolol oxide B	1654	2121	1,05
α-bisabolol	1687	2208	6,87
Non identifié B <sup>f</sup>	1948		2,38 <sup>c</sup>
<b>Total identifié:</b>			<b>88,56</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

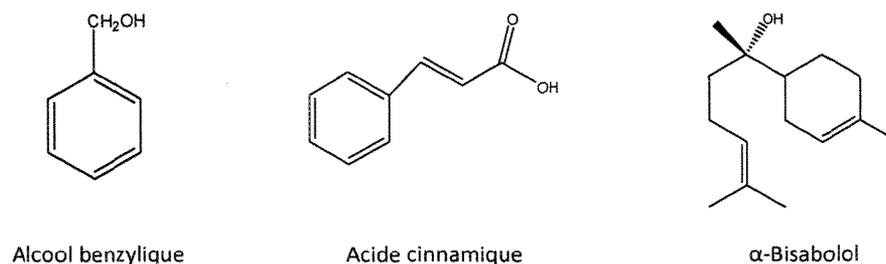
<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne apolaire DB-5.

<sup>d</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne polaire Supelcowax.

<sup>e</sup> *m/z* (intensité relative): 154 (100), 67(53), 59(37), 95(37), 126 (33), 111 (25), 41 (23), 53(18), 139 (11).

<sup>f</sup> *m/z* (intensité relative): 91 (100), 121 (32), 137 (17), 213 (12), 77 (13), 65 (11), 107 (6), 43 (6).

Tout comme pour l'hydrolat de *Solidago puberula*, la composition de l'hydrolat de *Populus balsamifera* diffère de celle de l'huile essentielle correspondante. Le composé majoritaire de cet hydrolat est l'alcool benzylque (32,6%), suivi de l'acide cinnamique (10,2%) et de l'α-bisabolol (6,9%). Ce dernier est aussi le composé majoritaire de l'huile essentielle (31,4%, chapitre 5). D'autres composés de l'huile sont également présents dans l'hydrolat: le 1,8-cinéole (2,6%), l'α-terpinéol (2,5%), le *trans*-nérolidol (0,6%), l'α-bisabolol oxide B (1,0%), le τ-cadinol (0,4%) et le τ-muurolol (0,2%). Tous les autres composés sont propres à l'hydrolat.



**Figure 26.** Structure des composés majoritaires de l'hydrolat de *Populus balsamifera*

### 7.3.3. Activité antioxydante

L'hydrolat de *Populus balsamifera* n'a pas montré d'activités anticancéreuse, antifongique et antibactérienne remarquables. Cependant l'activité antioxydante est très intéressante ( $23 \pm 10$   $\mu\text{Mol Trolox/mg}$ ).

### 7.4. *Monarda didyma*

Lors du criblage biologique, l'huile essentielle de *Monarda didyma* (Figure 27) s'est démarquée par son activité antioxydante ( $10,2 \pm 0,2$   $\mu\text{Mol Trolox/mg}$ ). Une étude plus poussée de cette plante a donc été entreprise. L'huile essentielle de fleurs et feuilles de *Monarda didyma* a donc été extraite à partir de plantes ornementales, car la plante était introuvable à l'état sauvage. La monarde *didyma* est originaire de l'Amérique de Nord. C'est aujourd'hui une plante très prisée pour l'ornement des jardins [Scora et al., 1967]. Cette variété de monarde est consommée sous forme d'infusion (*Oswego tea*) en médecine traditionnelle. Elle est utilisée pour soulager les problèmes digestifs. Les feuilles et les fleurs sont diurétiques, expectorantes, spasmolytiques et

stimulantes. Du fait de leur fort arôme citronné, les feuilles sont utilisées pour aromatiser les préparations culinaires [Carnat *et al.*, 1991; Savickiene *et al.*, 2002].



**Figure 27.** Photo de *Monarda didyma*

Dans la littérature scientifique, il n'existait aucun article faisant part de la composition chimique, ni même de l'activité antioxydante, de l'huile essentielle de *Monarda didyma* sauvages d'Amérique de Nord. Cependant, au moment de la découverte de ces résultats, des chercheurs italiens ont publiés dans *Journal of Essential Oil Research* la composition de l'huile essentielle de monarde *didyma* non sauvage d'Europe du Sud. De plus, cet article présente l'activité antioxydante de cette huile [Fraternale *et al.*, 2006].

#### **7.4.1. Huile essentielle de *Monarda didyma***

##### **7.4.1.1. Extraction**

Les feuilles et les fleurs de *Monarda didyma* ont été récoltées au début du mois d'août 2006, à Péribonka, au nord du lac Saint-Jean. L'huile essentielle des fleurs et des feuilles a été obtenue séparément. Une masse de 340 g de boutons floraux a permis d'obtenir 38,2 g d'huile

essentielle après 90 min d'extraction par entraînement à la vapeur. Le rendement correspondant est de 0,2%. Ensuite, l'huile essentielle des feuilles (79 g) a été extraite dans les mêmes conditions expérimentales. Une masse de 366 mg d'huile essentielle a été obtenue ce qui correspond à un rendement de 0,46%.

#### 7.4.1.2. Composition

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie gazeuse (GC-FID et GC-MS) et les résultats d'analyses sont présentés dans les tableaux 16 et 17 suivants. Tout d'abord en ce qui concerne l'huile essentielle de feuille de *Monarda didyma* (Tableau 16), 25 composés ont été identifiés au total ce qui correspond à un pourcentage de 97,8% par rapport à l'ensemble des constituants. Le composé majoritaire est le linalol (42,3%), suivi du germacrène D (17,7%). L'acétate de bornyle (8,0%), le sabinène (5,8%) et l'*o*-cymène (4,0%) sont également abondants.

**Tableau 16.** Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Monarda didyma*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	%
α-thujène	935	1026	0,14 <sup>c</sup>
α-pinène	940	1019	0,87 <sup>c</sup>
camphène	953	1064	1,49 <sup>c</sup>
Sabinène	976	1123	5,82 <sup>c</sup>
β-pinène	978	1106	0,98 <sup>c</sup>
oct-1-èn-3-ol	983	1458	2,12 <sup>c</sup>
Myrcène	992	1168	0,82 <sup>c</sup>
α-terpinène	1017	1177	0,26 <sup>c</sup>
<i>o</i> -cymène	1027	1275	3,96 <sup>c</sup>
Eucalyptol	1032	1193	0,95 <sup>c</sup>
Limonène	1033	1199	2,60 <sup>c</sup>
γ-terpinène	1068	1247	2,86 <sup>c</sup>
Terpinolène	1098	1287	0,56 <sup>c</sup>
<b>Linalol</b>	<b>1116</b>	<b>1557</b>	<b>42,26<sup>c</sup></b>
Bornéol	1168		1,18 <sup>d</sup>
<i>a</i> -terpinéol	1188	1698	2,39 <sup>d</sup>
acétate de bornyle	1293	1572	8,00 <sup>c</sup>

$\alpha$ -copaène	1376	1486	0,42 <sup>c</sup>
$\beta$ -caryophyllène	1415	1577	0,26 <sup>c</sup>
$\beta$ -copaène	1426	1581	0,20 <sup>c</sup>
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	1462	1668	0,18 <sup>c</sup>
germacrène D	1485	1698	17,73 <sup>c</sup>
$\alpha$ -farnésène	1514	1749	0,42 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -nérolidol	1564	2039	0,47 <sup>c</sup>
Octadécanol	2084		0,86 <sup>c</sup>
<b>Total:</b>			<b>97,80</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire

<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne apolaire DB-5

<sup>d</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne polaire Supelcowax

La composition de l'huile essentielle de fleurs (Tableau 17) est différente de celle de feuilles. Les composés majoritaires sont sensiblement les mêmes mais dans des proportions tout à fait différentes. Au total, 27 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 96,78%. Le composé majoritaire est le  $\gamma$ -terpinène (23,7%), suivi du linalol (14%), du sabinène (13,7%), de l'*o*-cymène (11,4%) et du germacrène D (11,8%).

**Tableau 17.** Composition chimique de l'huile essentielle de fleurs de *Monarda didyma*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
a-thujène	934	1026	0,37
a-pinène	940	1019	0,45
Camphène	953	1064	0,40
Sabinène	976	1122	13,75
$\beta$ -pinène	977	1106	0,58
oct-1-èn-3-ol	982	1458	0,26
Myrcène	992	1168	2,39
$\alpha$ -phellandrène	1001	1163	0,12
$\alpha$ -terpinène	1017	1177	1,44
<i>o</i> -cymène	1026	1275	11,43
Eucalyptol	1031	1193	1,88
Limonène	1033	1198	4,42
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	1057	1258	0,11
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	<b>1067</b>	<b>1247</b>	<b>23,67</b>
<i>trans</i> -sabinène hydrate	1074	1467	0,19
Terpinolène	1098	1286	1,09
Linalol	1111	1554	14,00
nonanol-2	1115	1533	0,14

nonanol-1	1177	1668	0,21
$\alpha$ -terpinéol	1188	1695	3,02
acétate de bornyle	1292	1570	3,28
$\alpha$ -copaène	1376	1485	0,27
$\beta$ -caryophyllène	1415	1575	0,20
$\beta$ -copaène	1426	1579	0,15
germacrène D	1482	1695	11,76
$\alpha$ -farnésène	1514	1749	0,22
Octadecanol	2084		0,98
<b>Total:</b>			<b>96,78</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne apolaire DB-5.

La composition chimique des huiles essentielles de fleurs et feuilles de *Monarda didyma* diffèrent grandement de celle provenant de la compagnie Aliksir (Annexe 1), dont le composé majoritaire est le carvacrol (51,7%) suivi du  $\gamma$ -terpinène (12,2%) et du linalol (8,3%). La composition de l'huile essentielle de *Monarda didyma* d'Italie [Fraternale *et al.*, 2006] est également différente puisque le composé majoritaire est le thymol dans l'huile de feuilles et de fleurs (57,3% et 51,7% respectivement) suivi du *p*-cymène (10,5% et 9,7%) et du  $\gamma$ -terpinène (9,3% et 14,3%).

#### 7.4.1.3. Activité antioxydante

Les huiles essentielles de fleurs et feuilles de *Monarda didyma* ont montré une activité antioxydante intéressante ( $1,3 \pm 0,5$   $\mu$ Mol Trolox/mg pour l'huile des feuilles et  $1,1 \pm 0,2$   $\mu$ Mol Trolox/mg pour l'huile des fleurs), mais beaucoup plus faible que celle mesurée pour l'huile essentielle de monarde provenant de la compagnie Aliksir ( $10,2 \pm 0,2$   $\mu$ Mol Trolox/mg). Cette différence vient du fait que le composé majoritaire de l'huile essentielle d'Aliksir est le carvacrol, composé bien connu pour son activité anti-oxydante [Edris, 2007]. L'indice ORAC obtenu au

laboratoire pour ce composé est de  $19 \pm 1$   $\mu\text{Mol}$  Trolox/mg. Ce composé antioxydant n'est pas présent dans les deux huiles de *monarda* récoltée au Lac St-Jean.

#### 7.4.2. Hydrolat de *Monarda didyma*

Lors de l'extraction par entraînement à la vapeur de l'huile essentielle de feuilles puis de fleurs de *Monarda didyma*, un volume d'hydrolat de 700 mL et 800 mL respectivement ont été obtenu. Ces hydrolats sont incolores et sont très odorants (odeur citronnée).

##### 7.4.2.1. Extraction

Les hydrolats ont été extraits avec 4 fois 125 mL de chloroforme. Les phases organiques réunies ont été séchées sur magnésium de sulfate anhydre, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Pour l'hydrolat de fleurs, un résidu huileux incolore est obtenu (46 mg, 0,066 mg/mL). Pour l'hydrolat de feuilles, un résidu huileux jaune pâle est obtenu (68,1 mg, 0,085 mg/mL).

##### 7.4.2.2. Composition

Les hydrolats ont été analysés par chromatographie gazeuse (GC-MS et GC-FID).

**Tableau 18.** Composition chimique de l'hydrolat de feuilles de *Monarda didyma*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	%
oct-1-èn-3-ol	983	1458	5,77 <sup>c</sup>
1,8-cinéole	1034	1198	3,03 <sup>c</sup>
alcool benzylique	1037	1868	0,20 <sup>c</sup>
oxyde de <i>trans</i> -linalol	1082	1440	0,19 <sup>c</sup>
oxyde de <i>cis</i> -linalol	1099	1472	0,31 <sup>c</sup>
<b>Linalol</b>	<b>1116</b>	<b>1556</b>	<b>71,21<sup>c</sup></b>
Bornéol	1168	1695	2,79 <sup>c</sup>
acétate de benzyle	1172	1736	0,20 <sup>c</sup>

terpinèn-4-ol	1178	1591	1,21 <sup>c</sup>
α-terpinéol	1190	1695	7,84 <sup>c</sup>
Endo acétate de fenchyle	1220	1469	0,83 <sup>c</sup>
chlorure de géranyle	1253		0,16 <sup>c</sup>
Géraniol	1261	1847	0,21 <sup>c</sup>
acétate de bornyle	1293	1571	1,29 <sup>c</sup>
butyrate de géranyle	1565	1902	0,10 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -nérolidol	1567	2040	0,17 <sup>c</sup>
τ-muurolol	1646	2154	0,08 <sup>d</sup>
τ-cadinol	1646	2171	0,12 <sup>d</sup>
β-eudesmol	1652	2210	0,17 <sup>c</sup>
<b>Total identifié:</b>			<b>95,90</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne DB-5.

<sup>d</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne Supelcowax 10.

L'hydrolat de feuilles de *Monarda didyma* (Tableau 18) contient le linalol comme composé majoritaire (71,2%) tout comme l'huile essentielle correspondante (42,3%). D'autres composés de l'huile sont retrouvés dans l'hydrolat: l'oct-1-èn-3-ol (5,8%), le bornéol (2,8%), l'α-terpinéol (7,8%) et l'acétate de bornyle (1,3%). Quelques alcools sesquiterpéniques sont présents mais en très faible quantité: le *trans*-nérolidol (0,2%), le β-eudesmol (0,2%), le τ-muurolol (0,1%) et le τ-cadinol (0,1%). Le germacrène D qui est abondant dans l'huile essentielle (17,7%) est totalement absent dans l'hydrolat.

**Tableau 19.** Composition chimique de l'hydrolat de fleurs de *Monarda didyma*

Composés	IK DB-5 <sup>a</sup>	IK Spwax <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
oct-1-èn-3-ol	983	1457	1,55 <sup>c</sup>
benzaldéhyde	961	1519	0,22 <sup>c</sup>
<i>o</i> -cymène	1027	1273	0,44 <sup>c</sup>
1,8-cinéole	1034	1198	8,64 <sup>c</sup>
alcool benzylique	1037	1868	0,14 <sup>c</sup>
γ-terpinène	1068	1246	0,27 <sup>c</sup>
oxyde de <i>trans</i> -linalol	1082	1440	0,34 <sup>c</sup>
oxyde de <i>cis</i> -linalol	1099	1471	0,52 <sup>c</sup>
<i>cis</i> sabinène hydrate	1108	1546	0,79
<b>Linalol</b>	<b>1114</b>	<b>1554</b>	<b>44,59<sup>c</sup></b>
Alcool phényl éthylique	1121	1917	0,11 <sup>c</sup>
Bornéol	1168		1,47 <sup>c</sup>
acétate de benzyle	1172	1736	0,38 <sup>c</sup>

terpinèn-4-ol	1178	1591	2,28 <sup>c</sup>
$\alpha$ -terpinéol	1190	1695	24,95 <sup>c</sup>
citronellol	1231	1794	0,11 <sup>c</sup>
Géranioïl	1261	1846	0,76 <sup>c</sup>
acétate de bornyle	1293	1570	0,74 <sup>c</sup>
acétate d' $\alpha$ -terpinyle	1359	1695	0,29 <sup>c</sup>
1-hydroxylinalol	1367	2339	3,60 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -nérolidol	1568	2043	0,42 <sup>c</sup>
$\beta$ -eudesmol	1652	2209	0,13 <sup>c</sup>
<b>Total identifié:</b>			<b>92,74</b>

<sup>a</sup> Indice de rétention sur la colonne DB-5 apolaire.

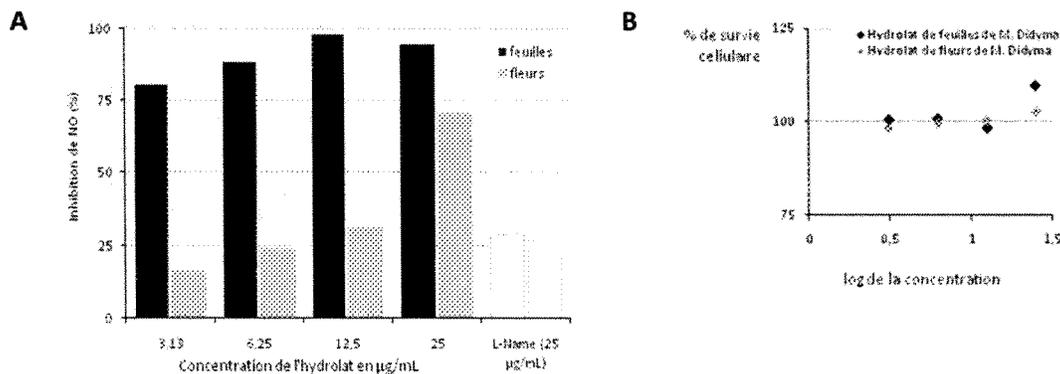
<sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne Supelcowax 10 polaire.

<sup>c</sup> Pourcentage déterminé à l'aide de la colonne DB-5.

La composition de l'hydrolat de fleurs de *Monarda didyma* (Tableau 19) est proche de celle de l'hydrolat de feuilles (tableau 18). Le composé majoritaire est encore ici le linalol (44,5%), suivi de l' $\alpha$ -terpinéol (24,9%). Le linalol est présent en grande quantité (14,0%) dans l'huile essentielle correspondante. L' $\alpha$ -terpinéol est également présent mais en plus faible quantité (3,0%) que dans l'hydrolat. Le  $\gamma$ -terpinène et l'*o*-cymène, qui sont de monoterpènes majoritaires de l'huile essentielle de fleurs (23,7% et 11,4% respectivement) sont présents dans l'hydrolat mais en quantité infime (0,3% et 0,4% respectivement).

#### 7.4.2.3. Activité anti-inflammatoire

Le potentiel antioxydant des hydrolats a été évalué mais les résultats obtenus ne sont pas concluants. Par contre le test d'activité anti-inflammatoire a révélé des résultats très positifs concernant l'hydrolat de feuilles de *Monarda didyma* (Figure 28).



**Figure 28.** A) Activité anti-inflammatoire et B) toxicité des hydrolats de feuilles et de fleurs de *Monarda didyma*

D'après les résultats présentés dans la figure ci-dessus, l'hydrolat des feuilles de *Monarda didyma* exerce une activité anti-inflammatoire remarquable et beaucoup plus importante que celle de l'hydrolat de fleurs. Dès la première concentration (3,13 µg/mL), une inhibition de 80,6% de la production de NO est observée et ce taux d'inhibition est plus élevé que celui obtenu avec le L-Name à 25 µg/mL (29,1 %). À la concentration de 12,5 µg/mL, le taux d'inhibition s'élève à 97,8%. De plus, aucune toxicité n'est observée selon le test parallèle à la résazurine pour les quatre concentrations. L'hydrolat de fleurs exerce une activité beaucoup moindre mais toutefois intéressante notamment à la concentration de 25 µg/mL pour laquelle le taux d'inhibition mesuré (70,4%) est plus important que celui obtenu avec le standard positif L-Name à la même concentration (26%). Le linalol, composé majoritaire de l'hydrolat de feuilles (71,2%) doit être responsable en grande partie de cette activité de l'hydrolat car l'activité anti-inflammatoire de ce monoterpène a déjà été mis en évidence en utilisant le test de l'oédème plantaire induit par la carraghénane [Paena *et al.*, 2002]. Les hydrolats de *Monarda didyma* constituent donc un sujet de

recherche intéressant à poursuivre d'autant plus que l'activité anti-inflammatoire de cette plante n'a jamais été décrite dans la littérature. De plus, ces résultats seraient de bons exemples pour mettre en évidence le potentiel pharmacologique des hydrolats.

## CHAPITRE 8

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

Les travaux de recherche entrepris au cours de ce projet de maîtrise auront permis, dans un premier lieu, de mettre en lumière le potentiel pharmacologique des huiles essentielles de diverses plantes de la forêt boréale ainsi que celui de leurs constituants volatils. Lors du criblage biologique réalisé sur une dizaine d'huiles essentielles, celle issue des bourgeons de *Populus balsamifera* s'est distinguée par son activité cytotoxique sur les lignées cancéreuses de poumon et côlon. Cette huile essentielle n'avait auparavant fait l'objet d'aucune étude pharmacologique et sa composition chimique n'avait jamais été clairement établie. L' $\alpha$ -bisabolol, le composé majoritaire, s'est révélé être en partie responsable de l'activité anticancéreuse de l'huile essentielle. Seule l'activité anti-gliomale de ce composé avait été antérieurement mise en évidence par une équipe de chercheurs italiens. Comme bon nombre de sesquiterpènes, l' $\alpha$ -bisabolol existe dans la nature sous forme glycosidée. Le fucopyranoside d' $\alpha$ -bisabolol en est un exemple. Alors que les molécules volatiles glycosidées sont fréquemment isolées à partir d'extraits de plantes, la synthèse organique de cette classe de dérivés est quasiment inexistante dans la littérature scientifique. Par conséquent, une méthode de glycosidation de l' $\alpha$ -bisabolol a été mise au point au cours de ce projet en utilisant la méthode des trichloroacétimidates. Six dérivés glycosidés (rhamnoside, glucoside, galactoside, mannoside, fucoside et xyloside d' $\alpha$ -bisabolol) ont ainsi été obtenus pour la première fois par voie de synthèse et avec de bons rendements. Cette méthode de synthèse

pourrait facilement être généralisée pour la synthèse d'autres dérivés glycosidés de molécules volatiles.

En ce qui concerne leur potentiel pharmacologique, la plupart des dérivés glycosidés de l' $\alpha$ -bisabolol ont exercé une activité cytotoxique plus forte que celle de la molécule initiale. Le rhamnoside d' $\alpha$ -bisabolol a exercé l'activité la plus forte avec en plus une selectivité très intéressante par rapport au cancer du poumon. L'ajout d'une section sucre sur l' $\alpha$ -bisabolol a donc permis de bonifier son activité anticancéreuse. De plus, puisque l' $\alpha$ -bisabolol a été reconnu pour son potentiel anti-gliomale, l'activité cytotoxique de ses dérivés glycosidés a également été évaluée vis-à-vis des cellules cancéreuses du cerveau. À nouveau, l'activité anticancéreuse s'est trouvée grandement améliorée et le rhamnoside d' $\alpha$ -bisabolol présentait, encore une fois, la plus forte activité cytotoxique. De plus, selon les prédictions *in silico* des propriétés structurales des glycosides d' $\alpha$ -bisabolol, les valeurs optimales de diffusion passive au travers de la barrière hémato-encéphalique sont respectées. À l'étude de ces résultats, les dérivés glycosidés de l' $\alpha$ -bisabolol, et plus particulièrement le rhamnoside d' $\alpha$ -bisabolol, apparaissent comme de bons candidats pour de futurs tests d'activité sur un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique. Ce modèle reproduit *in vitro* plusieurs caractéristiques structurales et métaboliques de la barrière hémato-encéphalique *in vivo*. Il s'agit d'une coculture de cellules endothéliales cérébrales et de cellules glialesensemencées de part et d'autre d'un filtre. Si ce test préalable est validé, il serait ensuite intéressant de poursuivre l'étude sur des modèles murins.

D'autre part, une toute première étude phytochimique de la *Solidago puberula*, une espèce de verge d'or, a été réalisée. La composition de son huile essentielle a été analysée pour la

première fois ainsi que son potentiel pharmacologique. L'huile essentielle a exercé une activité anticancéreuse et anti-inflammatoire modérée mais non négligable. Ces résultats sont acceptés pour publication dans la revue *Journal of Essential Oil Research*. Puisqu'aucune étude de la composition de cette plante n'avait été entreprise auparavant, des extractions par solvants des composés non volatils ont été réalisées. Ces extraits pourront faire l'objet d'une étude phytochimique complète (isolement des composés), en particulier, l'extrait obtenu au dichlorométhane, car celui-ci a montré une bonne activité cytotoxique sur les lignées cancéreuses de poumon et de côlon ainsi qu'une activité anti-inflammatoire remarquable.

Enfin, le criblage biologique a également permis de mettre en évidence l'activité anticancéreuse des huiles essentielles de *Hypericum perforatum* et de *Juniperus communis*. Bien que la composition chimique de ces deux huiles soit déjà connue, ces résultats d'activité pourraient faire l'objet de deux publications.

Une autre part importante de ce projet de maîtrise est l'étude du produit secondaire de l'hydrodistillation, l'hydrolat. Pour la première fois au laboratoire LASEVE, le potentiel pharmacologique des hydrolats a été mis en évidence ainsi que leur originalité vis-à-vis de l'huile essentielle. La composition chimique des hydrolats est en effet bien différente de celle de l'huile essentielle. De ce fait, les activités diffèrent également. Plusieurs hydrolats ont exercé des activités biologiques intéressantes et parfois plus fortes que celle de l'huile essentielle correspondante. Ainsi, les hydrolats de fleurs de *Solidago puberula* et de feuilles de *Monarda didyma* ont montré une forte activité anti-inflammatoire alors que les huiles essentielles correspondantes étaient peu actives. Quant à l'hydrolat de *Populus balsamifera*, celui-ci a démontré une activité antioxydante

très intéressante. Ces résultats pourraient faire l'objet de plusieurs publications qui mettraient en évidence le potentiel pharmacologique des hydrolats. À l'avenir, lors de l'extraction d'une huile essentielle par entraînement à la vapeur, il serait intéressant d'extraire systématiquement l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel pharmacologique. Puisque les hydrolats font l'objet de très peu d'études dans la littérature scientifique, ils constituent un créneau de recherche intéressant.

Finalement, l'objectif premier de ce projet de maîtrise a été atteint puisque tous les résultats obtenus mettent bien en évidence le potentiel pharmacologique des huiles essentielles et hydrolats issus des espèces végétales de la forêt boréale. Cette flore recèle de plantes dont la phytochimie et le potentiel pharmacologique n'ont encore jamais été étudiés ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Adams, R.P. 2001. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 455 p.
- Adams, R.P. 2007. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 803 p.
- Ahmad, H.; Tijerina, M.T.; Tobola, A.S. 1997. **Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin**. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236, 825-828.
- Alvaez-Castellanos, P.P.; Pascual-Villalobos, M.J. 2003. **Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain**. *Ind. Crops Prod.* 17, 77-81.
- Assad, Y.O.H.; Torto, B.; Hassanali, A.; Njagi, P.G.N.; Bashir, N.H.H.; Mahamat, H. 1997. **Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria***. *Phytochemistry* 44, 833-841.
- Aydin, S.; Seker, E. 2005. **Effect of an aqueous distillate of *Origanum onites* L. on isolated rat fundus, duodenum and ileum: Evidence for the role of oxygenated monoterpenes**. *Pharmazie* 60, 147-150.
- Béliveau, R.; Gingras, D. 2005. **Les aliments contre le cancer**. Édition du Trécarré. Outremont. 213 p.

- Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.M.; Bernardini, J.F.; Costa, J. 2007. **Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation.** Food Chem. 106, 132-139.
- Bergeron, C.; Marston, A.; Gauthier, R.; Hostettmann, K. 1996. **Screening of plants used by north american indians for antifungal, bactericidal, larvicidal and molluscicidal activities.** Int. J. Pharmacogn. 34, 233-242.
- Boyd, M. R. 1997. **Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval.** Anticancer Drug Development Guide. Teicher, B. A., Ed.; Humana Press. Totowa, NJ, pp. 23-42.
- Boyras, N.; Özcan, M. 2005. **Antifungal effect of some spice hydrosols.** Fitoterapia 76, 661-665.
- Boyras, N.; Özcan, M. 2006. **Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey.** Int. J. Food Microbiol. 107, 238-242.
- Braga, P.C; Dal Sasso M.; Culici M.; Galastri L.; Marceca M.T.; Guffanti E.E.; 2006. **Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems.** Pharmacology 76, 61-68.
- Branger, B. 2005. **National survey of nosocomial infection prevalence among newborns and under-eighteen children and adolescents in France.** Arch. Pediatr. 12, 1085-1093.
- Bremness, L. 1996. **L'oeil nature: Les plantes aromatiques et médicinales.** Bordas Nature Paris. 303 p.
- Bruneton, J. 1999. **Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales.** 2<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.

- Buchbauer, G; Jäger, W; Jirovetz, L; Ilmberger, J; Dietrich, H. 1993. **Therapeutic properties of essential oils and fragrances.** In: Bioactive Volatile Compounds from Plants, (R Teramishu, R G Buttery and H Sugisawa, eds). ACS Symposium Series 525 Washington DC: American Chemical Society. 159-165.
- Burt, S. 2004. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review.** Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.
- Butterfield D.; Lauderback, C. 2002. **Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress.** Free Radic. Biol. Med. 32, 1050-1060.
- Buttery, R.G.; Stern, D.J.; Ling, L.C. 1994. **Studies on flavor volatiles of some sweet corn products.** J. Agric. Food Chem. 42, 791-95.
- Calcabrini, A.; Stringaro, A.; Toccaceli, L.; Meschini, S.; Marra, M.; Colone, M.; Salvatore, G.; Mondello, F.; Arancia, G.; Molinari, A. 2004. **Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells.** J. invest. Dermatol. 122, 349-360.
- Caldefie-Chézet, F.; Guerry, M.; Chalchat, J.C.; Fusillier, C.; Vasson, M.P.; Guillot, J. 2004. **Anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes.** Free Radical Res. 38, 805-811.
- Caldefie-Chézet, F.; Fusillier, C.; Jarde, T.; Laroye H.; Damez, M.; Vasson, M.P. 2006. **Potential anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes.** Phytother. Res. 20, 364-370.

- Carnat, A.P.; Lamaison, J.L.; Rémerly, A. 1991. **Composition of leaf and flower essential oil from *Monarda didyma* L. cultivated in France.** Flav. Fragr. J. 6, 79-80.
- Carson, C.F.; Cookson, B.D.; Farrelly, H.D.; Riley, T.V. 1995. **Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*.** J. Antimicrob. Chemother. 35, 421-424.
- Cavaliere, E.; Mariotto, S.; Fabrizi, C.; Carcereri de Prati, A.; Gottardo, R.; Leone, S.; Berra, L.V.; Lauro, G.M.; Ciampa, A.R.; Suzuki, H. 2004.  **$\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells.** Biochem. Bioph. Res. Co. 315, 589-594.
- Carneseccchi, S.; Bras-Gonçalves, R.; Bradaia, A.; Zeisel, M.; Gossé, F.; Poupon, M.F.; Raul, F. 2004. **Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts.** Cancer Lett. 215, 53-59.
- Carneseccchi, S.; Langley, K.; Exinger, F.; Gossé, F.; Raul, F. 2002. **Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment.** J. Pharm. Exp. Ther. 301, 625-630.
- Catty, S. 2001. **Hydrosols, the next aromatherapy.** Healing Arts Press. Rochester. 290 p.
- Chan, C.H.; Loudon, K.W. 1998. **Activity of tea tree oil on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** J. Hosp. Infect. 39, 244-245.
- Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L.; Colnaghi, G.; Visinoni, F. 2006. **Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach.** Anal. Chim. Acta 555, 157-160.
- Deans, S.G.; Svoboda, K.P. 1989. **Antimicrobial activity of summer savory essential oil and its constituents.** J. Hort. Sci. 64, 205-210.

- Deans, S.G.; Svoboda, K.P. 1990. **The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L. volatile oil.** Flavour Frag. J. 5, 187-190.
- De Sousa, A.; Alviano, A.; Blank, A.; Alves, P.; Alviano, C.; Gattass, C. 2004. ***Melisa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities.** J. Pharm. Pharmacol. 56, 677-681.
- Dryden, M.S.; Dailly, S.; Crouch, M. 2004. **A randomized controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization.** J. Hosp. Infect. 58, 86-87.
- Ecker, G.F.; Noe, C.N. 2004. ***In silico* prediction models for blood-brain barrier permeation.** Curr. Med. Chem. 11, 1617-1628.
- Edris, A.E.; Shalaby, A.; Fadel, H. 2003. **Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) growing in Siwa Oasis, Egypt.** Eur. Food Technol. 218, 74-78.
- Edris, A.E. 2007. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review.** Phytother. Res. 21, 308-323.
- Egleton, R.D., Mitchell, S.A., Huber, J.D., Palian, M.M., Polt, R., Davis T.P. 2001. **Improved blood-brain barrier penetration and enhanced analgesia of an opioid peptide by glycosylation.** J. Pharm. Exp. Ther. 299, 967-972.
- El-Ghazaly, M.; Khayyal, M.T.; Okpanyi, S.N.; Arens-Corell, M. 1992. **Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*.** Arzneim.-Forsch./Drug Res. 42, 333-336.

- Fabian, D.; Sabol, M.; Domaracká, K.; Bujňáková, D. 2006. **Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability.** *Toxicol. in vitro* 20, 1435-1445.
- Farag, R.S.; Daw, Z.Y.; Hewedi, F.M. 1989. **Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils.** *J. Food Protect.* 52, 665-667.
- Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L.; Ceccarini, L.; Ricci, A.S.; Longo, I. 2007. **Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven.** *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40.
- Flaxman, D.; Griffiths, P. 2005. **Is tea tree oil effective at eradicating MRSA colonization? A review.** *Br. J. Community Nurs.* 10, 123-126.
- Forrester, J.M.; Money, T. 1972. **Sequence studies in biosynthesis: Trichothecin.** *Can. J. chem.* 50, 310-314.
- Francis, K.; Van Beek, J.; Canova, C.; Neal, J.W.; Gasque, P. 2003. **Innate immunity and brain inflammation the key role of complement.** *Expert Rev. Mol. Med.* 5, 1-19.
- Franchomme, P.; Péroël, D. 1990. **L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles.** Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- Fraternale, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Ricci, D.; Epifano, F.; Burini, G.; Curini, M. 2006. **Chemical composition, antifungal and *in vitro* antoxydant properties of *Monarda didyma* L. essential oil.** *J. Essent. Oil Res.* 18, 581-585.

- Fritsche, T.R.; Sader, H.S.; Stilwell, M.G.; Dowzicky, M.J.; Jones, R.N. 2005. **Antimicrobial activity of tigecycline tested against organisms causing community-acquired respiratory tract infection and nosocomial pneumonia.** *Diagn. Microbio. Infect. Dis.* 52, 187-193.
- Gardner, P. 1997. **Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling.** *Bioscience Rep.* 17, 33-42.
- Ge, S.; Song, L.; Patcher, J.S. 2005. **Where is the blood-brain barrier...really?** *J. Neuro. Res.* 79, 421-427.
- Green, S.J.; Meltzer, M.S.; Hibbs, J.B. Jr.; Nacy, C.A. 1990. **Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism.** *J. Immunol.* 144, 278-283
- Guba, R. 2001. **Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential.** *Int. J. Aromather.* 11, 76-83.
- Habersang, S.; Leuschner, F.; Isaac, O.; Thiemer, K. 1979. **Pharmacological studies with compounds of chamomile. IV. Studies on toxicity of (-)- $\alpha$ -bisabolol.** *Planta Med.* 37, 115-123.
- Hart, P.H.; Brand, C.; Carson, C.F.; Riley, T.V.; Prager, R.H.; Finlay-Jones, J.J. 2000. **Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes.** *Inflamm. Res.* 49, 619-626.
- He, M.; Du, M.; Fan, M.; Bian, Z. 2007. ***In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms.** *Mycopathologica* 163, 137-143.
- Hitchcock, S.A., Pennington, L.D. 2006. **Structure-brain exposure relationships.** *J. Med. Chem.* 49, 7559-7583.

- Homburger, F.; Boger, E. 1968. **The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review.** *Cancer Res.* 28, 2372-2374.
- Hua, Y.; Zhou, L.Y.; Xi, J.; Chen, C.X. 2004. **Eudesmane sesquiterpene glycosides from *Parapigynum funingense*.** *Fitoterapia* 75, 236-238.
- Jakovlev, V.; von Schlichtegroll, A. 1969. **On the inflammation inhibitory effect of (-)-alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil.** *Arzneim. Forsch.* 19, 615-616.
- Jakovlev, V.; Isaac, O.; Thiemer, K.; Kunde R. 1979. **Pharmacological investigations on the components of chamomile. II. New investigations on the anti-inflammatory effects of (-)- $\alpha$ -bisabolol and bisabolol oxides.** *Planta Med.* 35, 125-140.
- Jeannot, V.; Chahboun, J.; Russel, D.; Casabianca, H. 2003. ***Origanum compactum* Bentham: Composition of the hydrolat aromatic fraction, comparison with the essential oil and its interest in aromatherapy.** *Int. J. Aromather.* 13, 90-94.
- Kadir, R.; Barry, B.W. 1991.  **$\alpha$ -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics.** *Int. J. Pharm.* 70, 87-94.
- Kalembe, D.; Thiem, B. 2004. **Constituents of the essential oils of four micropopagated *Solidago* species.** *Flavour Frag. J.* 19, 40-43.
- Kalembe, D.; Kunicka, A. 2003. **Antibacterial and antifungal properties of essential oils.** *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- Kalembe, D.; Marschall, M.; Bradesi, P. 2001. **Constituents of the essential oil of *Solidago gigantea* Ait. (giant goldenrod).** *Flavour Frag. J.* 16, 19-26.

- Kasali, A.A.; Ekundayo, O.; Paul, C.; König, W.A. 2002. ***epi*-Cubebanes from *Solidago canadensis***. *Phytochemistry* 59, 805-810.
- Kim, S.G.; Liem, A.; Stewart, B.C.; Miller, J.A. 1999. **New studies on *trans*-anethole oxide and *trans*-asarone oxide**. *Carcinogenesis*. 20, 1303-1307.
- Koh, K.J.; Pearce, A.L.; Marshman, G.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. 2002. **Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation**. *Br. J. Dermatol.* 147, 1212-1217.
- Kovats, E. 1965. **Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System**. *Adv. Chromatogr.* 1, 229 p.
- Křen, V.; Martínková, L. 2001. **Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity"**. *Curr. Med. Chem.* 8, 1303-1328.
- Kurkin, V.A. 2003. **Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity**. *Chem. Nat. Compd.* 39, 123-153.
- Lee, B.K.; Kim, J.H.; Jung, J.W.; Choi, J.W.; Han, E.S.; Lee, S.H.; Ko, K.H.; Ryu, J.H. 2005. **Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma MSK-N-SH cells**. *Toxicol. Lett.* 157, 49-56.
- Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.C. 2003. **Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action**. *Planta Med.* 69, 402-407.
- Leuschner, J. 1995. **Anti-inflammatory spasmolytic and diuretic effect of a commercially available *Solidago gigantea* herb extract**. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45, 165-168.
- Li, Y.; Li, M.; Wang, L.; Jiang, Z.; Li, W.; Li, H. 2004. **Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annul* L**. *Sichuan Da ue Xue Bao Yi Xue Ban* (article en chinois). 35, 337-339 (Résumé en anglais disponible sur [www.pubmed.org](http://www.pubmed.org)).

- Lopes, N.P.; Kato, M.J.; Aguiar Andrade, H.; Soares Maia, J.G.; Yoshida, M. 1997. **Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Viola surinamensis* leaves.** *Phytochemistry* 46, 689-693.
- Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. 2004. **Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation.** *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. 2007. **Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil.** *J. Food Engineer.* 79, 1079-1086.
- Madhavan, B.N. 1999. **Final report on the safety assessment of bisabolol.** *Int. J. Toxicol.* 18, 33-40.
- Marie-Victorin, F. 2002. **Flore laurentienne.** 3<sup>e</sup> édition. Gaëtan Morin éditeur ltée. Boucherville. 1093 p.
- Marles, R.; Clavelle, C.; Monteleone, L.; Tays, N.; Burns D. 2000. **Aboriginal Plant Use in Canada's Northwest Boreal Forest.** University of British Columbia Press. 368 p.
- Maruyama, N.; Sekimoto, N.; Ishibashi, H. 2005. **Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil.** *J. Inflamm.* 2, 1-11.
- Mastelić, J.; Jerković I.; Vinković, M.; Džolić, Z.; Vikić-Topić, D. 2004. **Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. Their chromatographic and spectroscopic properties.** *Croat. Chem. Acta* 3, 491-500.
- Mbaïraroua, O.; Ton-That, T.; Tapiéro, C. 1994. **Synthèses de 6-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucoopyranosides de monoterpényle.** *Carbohydr. Res.* 253, 79-99.

- Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. 1993. **VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes**. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.
- Mikhova, B.; Duddeck, H.; Taskova, R.; Mitova, M.; Alipieva, K. 2004. **Oxygenated bisabolane fucosides from *Carthamus lanatus* L.** *Z. Naturforsch.* 59c, 244-248.
- Milner, J.A. 2006. **Preclinical perspectives on garlic and cancer. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease.** *J. Nutr.* 136, 827-831.
- Milner, J.A. 2001. **A historical perspective on garlic and cancer. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement.** *J. Nutr.* 131, 1027-1031.
- Mockute, D.; Bernotiene, G.; Judzentiene, A. 2001. **The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania).** *Phytochemistry* 57, 65-69.
- Modzelewska, A.; Sur, S.; Kumar, K.S.; Khan, S.R. 2005. **Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth.** *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents* 5, 477-499.
- Moerman, D. 1998. **Native American Ethnobotany.** Timber Press. Portland. 927 p.
- Morel, A.F.; Dias, G.O.; Porto, C.; Simionatto, E.; Stuker, C.Z.; Dalcol, I.I. 2006. **Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*.** *Fitoterapia* 77, 453-455.
- Miyase, T.; Ozaki, H.; Ueno, A. 1991. **Sesquiterpene glycosides from *Ainsliaea cordifolia* Franch. Et Sav.** *Chem. Pharm. Bull.* 39, 4, 937-938.
- Naganuma, M.; Hirose, S.; Nakayama, Y.; Nakajima, K.; Someya, T. 1985. **A study of the phototoxicity of lemon oil.** *Arch. Dermatol. Res.* 278, 31-36.

- Newton, H.B. 2006. **Advances in strategies to improve drug delivery to brain tumors.** Expert Rev. Neurotherapeutics 6, 1495-1509.
- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. 2000. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** Eur. J. Biochem. 267, 5421-5426.
- Ohloff, G. 1994. **Scent and Fragrances.** Springer-Verlag, Berlin. 238 p.
- Orihara, Y.; Furuya, T.; Hashimoto, N.; Deguchi, Y.; Tokoro, K.; Kanisawa, T. 1992. **Biotransformation of isoeugenol and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*.** Phytochemistry 31, 827-831.
- Ou B.; Hampsch-Woodill M.; Prior R.L. 2001. **Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe.** J. Agr. Food Chem. 49, 4619-4626.
- Paena, A.T.; D'Aquila, P.S.; Panin, F.; Pippia, P.; Moretti, M.D.L. 2002. **Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils.** Phytomedicine 9, 721-726.
- Patov, S.V.; Puneov, V.V.; Kuchin, A.V.; Froloa, L.L. 2006. **Synthesis of certain monoterpenoid glucosides.** Chem. Nat. Compd 42, 431-433.
- Pauli, A. 2001. **Antimicrobial properties of essential oil constituents.** Int. J. Aromather. 11, 126-133.
- Pellerin, P. 1991. **Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry.** Perfum. Flavor. 16, 4, 37-39.

- Piochon, M., Legault, J., Pichette, A. 2008. **Chemical composition of the essential oil from *Solidago puberula* Nutt. growing wild in the north of Quebec.** J. Ess. Oil Res. Numero: RN-2783.
- Price, L.; Price, S. 2004. **Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy.** Churchill Livingstone. 294 p.
- Proust, B. 2006. **Petite Géométrie des Parfums.** Éditions du Seuil. Paris. 126 p.
- Pyun, M.S.; Shin, S. 2006. **Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole.** Phytomedicine 13, 394-400.
- Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. 1990. **DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33 258 after cell lysis by freezing in distilled water.** Anal. Biochem. 191, 31-34.
- Richard, H. 1992. **Épices et Aromates.** Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- Robert, G. 2000. **Les Sens du Parfum.** Osman Eroyllles Multimedia. Paris. 224 p.
- Roy, S.; Khanna, S.; M. Alessio, H.; Vider, J.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; K. Sen, C. 2002. **Anti-angiogenic property of edible berries.** Free. Rad. Res. 36, 1023-1031.
- Rustaiyan, A.; Dabiri, M.; Gupta, R.K.; Bohlmann, F. 1981.  **$\alpha$ -Bisabolol-6-desoxy- $\beta$ -altropyranoside from *Carthamus turkistanikus*.** Phytochemistry 20, 1429-1430.
- San Feliciano, A.; Barrero, A.F.; Del Corral, J.M.M.; Gacimartin, M.V.; Medarde, M. 1982.  **$\alpha$ -Bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside from *Carthamus Lanatus*.** Phytochemistry 21, 2115-2117.

- Sagdiç, Ö.; Özcan, M. 2002. **Antibacterial activity of turkish spice hydrosols.** Food Control. 14, 141-143.
- Sagdiç, Ö. 2003. **Sensitivity of four pathogenic bacteria to turkish thyme and oregano hydrosols.** Lebensm-Wiss Technol. 36, 467-473.
- Savickiene, N.; Dagilyte, A.; Barsteigiene, Z.; Kazlauskas, S.; Vaiciuniene, J. 2002. **Identification of flavonoids in the flowers and leaves of *Monarda didyma* L.** Medicina 38, 1119-1122.
- Schmidt, R.R.; Kinzy, W. 1994. **Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: The trichloroacetimidate method.** Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 50, 21-123.
- Smith, C.K.; Moore, C.A.; Alahi, E.N.; Smart, A.T.; Hotchkiss, S.A. 2000. **Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 168, 189-99.
- Scora, R. 1967. **Study of the essential leaf oils of the genus *Monarda* (Labiatae).** Amer. J. Bot. 54, 446-452.
- Sell, C.S. 2003. **A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry.** The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 410 p.
- Sell, C.S. 2006. **The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer.** 2<sup>nd</sup> edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- Shah, S.P. 2003. **Drug delivery to the central nervous system: a review.** J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 6, 252-273.
- Stahl-Biskup, E.; Intert, F.; Holthuijzen, M.; Stengele, M.; Schulz, G.; 1993. **Glycosidically bound volatiles - A review 1986-1991.** Flav. Fragr. J. 8, 61-80.

Stewart, B.W.; Kleihues, P. 2005. **Le Cancer Dans le Monde**. IARC press. Lyon. 364 p.

Sylvestre, M.; Legault, J.; Dufour, D.; Pichette, A. 2005. **Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L.** Phytomedicine 12, 299-304.

Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F.; Legault, J. 2006. **Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe.** J. Ethnopharmacol. 103, 99-102.

Sylvestre, M.; Pichette, A.; Lavoie, S.; Longtin, A.; Legault, J. 2007. **Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* L.** Phytother. Res. 6, 536-540.

Tkachev, A.V.; Korolyuk, E.A.; Letchamo, W, 2006. **Volatile oil-bearing flora of Siberia VII: Essential oil composition and antimicrobial activity of wild *Solidago virgaurea* L. From the Russian Altai.** J. Essent. Oil Res. 18, 46-48.

Tesseire, P.J. 1991. **Chimie des Substances Odorantes.** Technique et documentation Lavoisier. Paris. 480 p.

Thiele, K.; Jakovlev, V.; Isaac, O.; Schuler, W.A. 1969. **Äther und ester von (-)- $\alpha$ -bisabolol und analogen mono- und sesquiterpenoiden mit antiphlogistischer wirkung.** Arzneimittel-Forsch. 19, 1878-1882.

Thompson, J.D.; Chalchat, J.C.; Michet, A.; Linhart, Y.B.; Ehlers, B. 2003. **Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes.** J. Chem. Ecol. 29, 859-880.

To, W.-K.; Fothergill A.W.; Rinaldi, M.G. 1995. **Comparative evaluation of macrodilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates.** J. Clin. Microbiol. 33, 2660-2664.

- Tucker, A.O.; Maciarello, M.J.; Clancy, K. 1999. **Sweet oldenrod (*Solidago Odora*, Asteraceae): A medicine tea and state herb.** Econ. Bot. 53, 281-284.
- Uedo, N.; Tatsuta, M.; Lishi, H.; Baba, M.; Sakai, N.; Yano, H.; Otani, T. 1999. **Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanimidine in wistar rats.** Cancer Lett. 137, 131-136.
- Vanier, P. 1994. **Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles.** Guide Ressources. 9, 69-73.
- Vasconcelos Silva, M.G.; Craveiro, A.A.; Abreu Matos, F.J.; Machado, M.I.L.; Alencar, J.W. 1999. **Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*.** Fitoterapia 70, 32-34.
- Vasserot, Y.; Arnaud, A.; Galzy, P. 1995. **Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation.** Acta Biotechnol. 15, 77-95.
- Vijayakumar, G.R.; Divakar, S. 2007. **Amyloglucosidase-catalyzed synthesis of eugenyl and curcuminyl glycosides.** Biotechnol. Lett. 29, 575-584.
- Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; Furlán, R.; Zacchino, S.; Casanova, J.; Cañigüreal, S. 2002. **Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*.** Planta med. 68, 164-167.
- Wang, G.; Li, X.; Huang, F.; Zhao, H.; Ding, H.; Cunningham, C.; Coad, J.E.; Flynn, D.C.; Reed, E.; Li, Q.Q. 2005. **Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death.** Cell. Mol. Life Sci. 62, 881-893.
- Wiseman, R.W.; Miller, E.C.; Liem, A. 1987. **Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on**

**administration to preweanling male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice.** *Cancer Res.* 47, 2275-2283.

Wenqiang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. 2007. **Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods.** *Food chem.* 1001, 1558-1564.

Wu, C.C.; Sheen L.Y.; Chen, H.W.; Kuo, W.W.; Tsai, S.J.; Lii, C.K. 2002. **Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats.** *J. Agric. Food Chem.* 50, 378-383.

Yanagisawa, H.; Ohshima, Y.; Okada, Y.; Takahashi, K.; Shibata, S. 1998. **A sesquiterpene glycoside, Loquatifolin A, from the leaves of *Eriobotrya japonica*.** *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4, 1270-1274.

Yoshioka, H.; Mabry, T.J.; Higo, A. 1969. **(+)- $\beta$ -Eudesmol *O*- $\alpha$ -L-Arabopyranoside. A new sesquiterpene glycoside from *Machaeranthera tanacetifolia* (H.B.K.) nees (compositae).** *J. Org. Chem.* 34, 11, 3697.

Zheng, G.; Kenny, P.; Lam, L. 1992. **Inhibition of benzo[a]-pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil.** *Carcinogenesis* 13, 1921-1923.

**ANNEXE 1****COMPOSITION DES HUILES ESSENTIELLES SÉLECTIONNÉES**

## Huile essentielle d'*Asarum canadense*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4934

Aspect physique: jaune pâle

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
$\alpha$ -pinène	12,58	940	1,11	1,09	1020	6,41
camphène	13,39	953	0,33	0,33	1065	7,83
sabinène	14,98	976	0,51	0,50	1123	10,12
$\beta$ -pinène	15,10	977	1,12	1,11	1107	9,43
$\alpha$ -phéllandrène	16,91	1001	0,10	0,09	1164	12,16
myrcène	19,91	992	1,10	1,08	1168	12,39
para-cymène	18,22	1026	0,38	0,38	1275	17,88
limonène	18,51	1032	0,60	0,50	1193	13,86
$\beta$ -phéllandrène	18,51	1032		0,10	1200	14,29
1,8-cinéole	18,66	1034	0,23	0,22	1199	14,18
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimène	19,32	1046	0,33	0,34	1242	16,19
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	19,99	1058	0,62	0,62	1260	17,09
g-terpinène	20,57	1067	0,09	0,10	1248	16,47
terpinoène	22,55	1098	0,25	0,21	1287	18,55
linalol	23,50	1112	17,24	17,28	1554	34,81
terpin-1-èn-4-ol	28,54	1178	0,49	0,62	1591	37,34
$\alpha$ -terpinéol	29,48	1189	5,55	5,67	1694	42,74
nérol	32,15	1231	1,15	1,20	1796	48,47
géraniol	33,97	1262	3,55	3,86	1848	51,00
acétate de linalyle	34,10	1264	7,94	7,85	1559	35,17
acétate de bornyle	35,86	1293	0,81	0,81	1570	35,92
acétate de néryle	41,07	1369	1,35	1,45	1728	44,59
acétate de géranyle	42,28	1386	2,95	2,99	1758	46,25
<b>methyl eugénol</b>	<b>43,52</b>	<b>1403</b>	<b>40,44</b>	<b>40,61</b>	<b>2007</b>	<b>59,12</b>
élémicine	52,49	1559	1,17	1,16	2221	68,92
non identifié	55,02	1598	0,69			
5-épi-7- $\alpha$ -eudesmol	55,60	1609	2,46	1,41	2033	60,24
non identifié	55,60	1609		1,04	2205	68,27
non identifié	57,36	1645	1,00			
(E)-isoélémicine	57,71	1652	1,34	0,77	2390	76,15
tertradécanol	59,16	1681	0,35	0,30	2180	67,09
<b>Total identifié:</b>			<b>95,24</b>		<b>93,68</b>	

## Huile essentielle de *Juniperus communis*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4677

Aspect physique: incolore

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
tricyclène	11,89	928	0,18	0,18	1004	5,97
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>12,61</b>	<b>940</b>	<b>75,78</b>	<b>75,55</b>	<b>1021</b>	<b>6,43</b>
$\alpha$ -fenchène	13,32	952	0,29	0,30	1057	7,56
camphène	13,40	953	0,60	0,60	1065	7,84
sabinène	14,98	976	0,19	0,19	1123	10,12
$\beta$ -pinène	15,10	977	4,02	4,04	1107	9,43
myrcène	16,23	992	3,91	3,94	1168	12,40
$\delta$ -3-carène	17,29	1008	5,57	5,53	1149	11,36
limonène	18,51	1031	2,21	1,50	1194	13,86
$\beta$ -phéllandrène	18,51	1031		0,75	1201	14,30
terpinolène	22,55	1098	0,74	0,71	1287	18,55
terpin-1-èn-4-ol	28,54	1178	0,14	0,17	1591	37,34
$\alpha$ -terpinéol	29,48	1189	0,31	0,53	1694	42,75*
citronellol	32,26	1233	0,28	0,35	1768	46,82
acétate de bornyle	35,86	1293	0,45	0,46	1570	35,92
$\beta$ -élémente	42,61	1390	0,11		1579	36,55*
$\beta$ -caryophyllène	44,14	1415	0,10	0,22	1579	36,55
germacrène D	47,87	1482	0,18		1694	42,75*
$\alpha$ -farnésène	49,68	1513	0,13	0,14	1738	45,15
$\delta$ -cadinène	50,45	1526	0,21	0,26	1748	45,67
germacrène B	52,21	1554	0,26	0,26	1806	49,00
<i>trans</i> -nérolidol	52,86	1565	0,42	0,45	2042	60,63
non identifié	61,47	1725	0,30	0,33	2352	74,46
<b>Total identifié:</b>			<b>96,20</b>	<b>96,27</b>		

## Huile essentielle de *Daucus carota*

Provenance: Alik sir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4710

Aspect physique: incolore

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
$\alpha$ -thujène	12,27	935	0,31	0,40	1026	6,60
$\alpha$ -pinène	12,61	940	16,15	16,22	1019	6,40
Camphène	13,41	953	0,78	0,79	1064	7,82
<b>sabinène</b>	<b>15,02</b>	<b>976</b>	<b>36,75</b>	<b>36,71</b>	<b>1122</b>	<b>10,13</b>
$\beta$ -pinène	15,13	978	3,39	3,51	1106	9,41
myrcène	16,25	992	4,43	4,44	1168	12,38
$\alpha$ -terpinène	17,74	1017	0,37	0,39	1176	12,88
para-cymène	18,23	1026	1,03	1,04	1274	17,87
limonène	18,53	1032	3,76	3,43	1193	13,85
$\beta$ -phellandrène	18,53	1032		0,36	1200	14,27
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimène	19,33	1046	0,76	0,76	1241	16,18
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	20,00	1058	0,25	0,25	1269	17,08
$\gamma$ -terpinène	20,58	1068	0,98	1,00	1247	16,45
terpinolène	22,56	1099	0,36	0,34	1287	18,53
linalol	23,48	1112	0,71	0,70	1553	34,79
terpin-1-én-4-ol	28,54	1178	1,85	1,82	1590	37,33
$\alpha$ -terpinéol	29,49	1189	0,19		1695	42,80
<i>cis</i> sabinène hydrate?	21,12	1076	0,28	0,30	1466	29,52
acétate de bornyle	35,87	1293	2,89	2,87	1570	35,91
acétate de géranyle	42,30	1386	12,42	12,34	1758	46,26
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	1,45	1,48	1579	36,54
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	46,71	1462	0,60	0,85	1668	41,36
$\alpha$ -humulène	46,20	1453	0,17	0,18	1652	40,57
$\gamma$ -muurolène?	47,48	1475	0,74	0,86	1676	41,78
bicyclogermacrène	48,71	1497	0,19	0,12	1720	44,13
$\gamma$ -himachalène?	47,87	1482	1,33	1,34	1723	44,29
germacrène D	48,14	1487	0,40	0,38	1704	43,24
$\beta$ -bisabolène	49,68	1513	1,34	1,34	1723	44,29
$\delta$ -cadinène	50,45	1526	0,30	0,21	1752	45,90
carotol	54,45	1589	0,41	0,40	1996	58,63
<b>Total identifié:</b>			<b>94,58</b>	<b>94,82</b>		

## Huile essentielle de *Monarda Didyma*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4962

Aspect physique: jaune pâle

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
α-thujène	12,27	935	1,12	1,25	1027	6,60
α-pinène	12,60	940	0,38	0,39	1020	6,40
camphène	13,41	953	0,12	0,12	1065	7,82
sabinène	15,00	976	0,28	0,28	1122	10,11
β-pinène	15,11	977	0,15	0,15	1107	9,41
oct-1-èn-3-ol	15,53	983	3,68	3,66	1458	29,02
myrcène	16,25	992	1,62	1,61	1168	12,38
octan-3-ol	16,57	996	0,46	0,46	1395	25,61
α-phellandrène	16,93	1001	0,25	0,24	1164	12,15
α-terpinène	17,74	1017	2,00	1,99	1177	12,88
p-cymène	18,24	1026	5,83	5,79	1275	17,87
limonène	18,53*	1032	0,76	0,61	1193	13,85
β-phellandrène	18,53*	1032		0,17	1200	14,28
1,8-cinéole	18,67	1034	0,36	0,36	1198	14,17
γ-terpinène	20,59	1068	12,23	12,13	1248	16,46
sabinène hydrate (cis)	21,12	1076	0,34	0,33	1467	29,52
linalol	23,49	1112	8,26	8,30	1553	34,80
bornéol	27,73	1168	0,10		1695	42,79
terpin-1-èn-4-ol	28,55	1178	0,60	0,60	1590	37,33
α-terpinéol	29,49	1189	0,44		1695	42,79
thymol méthyl éther	32,55	1238	0,11	0,09	1588	37,13
carvacol méthyl éther	33,15	1248	1,47	1,49	1595	37,69
géraniol	33,98	1262	0,46	0,61	1848	50,99
acétate d'isobornyle	35,88	1293	0,23	0,24	1570	35,91
thymol	36,49	1303	3,46	3,48	2183	67,23
<b>carvacrol</b>	<b>37,11</b>	<b>1312</b>	<b>51,66</b>	<b>51,65</b>	<b>2207</b>	<b>68,37</b>
β-caryophyllène	44,15	1415	0,70	0,69	1579	36,54
germacrène D	47,87	1482	1,02	1,59	1695	42,79
α-farnésène	49,75	1514	0,24	0,22	1750	45,82
<b>Total identifié:</b>			<b>98,32</b>	<b>96,46</b>		

## Huile essentielle de *Monarda fistulosa*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4731

Aspect physique: Incolore

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
<i>cis</i> -hex-èn-3-ol	8,67	864	0,12	0,12	1026	6,57
oct-1-èn-3-ol	15,53	983	0,40	0,38	1458	29,02
myrcène	16,24	992	0,69	0,70	1168	12,38
<i>p</i> -cymène	18,23	1026	0,16	0,16	1275	17,87
limonène	18,52	1032	0,13	0,12	1193	13,85
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimène	19,33	1046	0,24	0,25	1242	16,18
Isovalérate de butyle	20,00	1058	0,35	0,37	1260	17,08
$\gamma$ -terpinène	20,58	1067	0,44	0,43	1247	16,45
linalol	23,48	1112	1,37	1,33	1553	34,79
nérol	32,16	1231	0,67	0,67	1795	48,47
néral	32,91	1244	0,50	0,44	1675	41,74
<b>géraniol</b>	<b>34,09</b>	<b>1264</b>	<b>90,80</b>	<b>91,00</b>	<b>1849</b>	<b>51,04</b>
géranial	34,92	1278	0,68	0,70	1728	44,57
$\alpha$ -copaène	41,55	1376	0,12	0,12	1486	30,63
$\beta$ -bourbonène	42,06	1383	0,21	0,20	1512	32,15
acétate de géranyle	42,29	1386	0,15	0,16	1758	46,24
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	0,33	0,34	1579	36,54
germacrène D	47,87	1482	1,59	1,60	1695	42,80
non identifié	81,26	2139	0,16	0,17	1746	45,60
<b>Total identifié:</b>			<b>99,11</b>	<b>99,25</b>		

## Huile essentielle de *Tanacetum vulgare*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4616

Aspect physique: jaune pâle

Identification	DB-5			Spwax		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
<i>cis</i> -hex-3-èn-1-ol	8,66	863	0,20	0,20	1385	24,87
hexanol	9,32	878	0,17	0,16	1360	23,06
tricyclène	11,88	928	0,06	0,06	1005	5,96
$\alpha$ -pinène	12,59	940	0,27	0,27	1020	6,41
camphène	13,40	953	0,83	0,85	1065	7,83
sabinène	14,98	976	1,06	1,06	1123	10,12
$\beta$ -pinène	15,10	977	0,16	0,16	1107	9,43
$\alpha$ -terpinène $\alpha$	17,73	1017	0,13	0,13	1177	12,90
myrcène	16,24	992	0,07	0,05	1168	12,94
p-cymène	18,22	1026	0,33	0,34	1275	17,88
limonène	18,51	1032	0,13	0,11	1193	13,86
$\beta$ -phéllandrène	18,66	1034	0,80	0,81	1199	14,18
$\gamma$ -terpinène	20,57	1067	0,24	0,25	1248	16,47
$\alpha$ -thujone	23,64	1114	0,96	0,97	1409	26,45
<b><math>\beta</math>-thujone</b>	<b>24,45</b>	<b>1126</b>	<b>68,26</b>	<b>68,61</b>	<b>1433</b>	<b>27,68</b>
<i>trans</i> -pinocarvéol	25,76	1143	0,26	0,24	1659	40,90
camphre	26,15	1149	9,66	9,48	1504	31,70
bornéol	27,69	1168	0,27	0,27	1699	43,02
umbellulone?	27,84	1170	0,47			
terpin-1-èn-4-ol	28,54	1178	0,66	0,66	1591	37,34
<i>cis</i> -dihydrocarvone	29,70	1192	0,11	0,12	1604	38,19
myrtenal	29,86	1194	0,18	0,16	1606	38,30
eugénol	40,36	1360	0,12	0,17	2157	65,95
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	0,78	0,77	1579	36,55
germacrène-D	47,88	1482	7,92	8,02	1696	42,82
bicyclogermacrène	48,80	1498	0,70	0,67	1720	44,14
$\beta$ -eudesmol	57,68	1652	0,18	0,19	2212	68,56
<b>Total identifié:</b>			<b>94,91</b>	<b>94,73</b>		

## Huile essentielle de *Solidago Canadensis*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4907

Aspect physique: légèrement jaune pâle

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
$\alpha$ -thujène	12,25	935	0,32	0,52	1027	6,61
$\alpha$ -pinène	12,59	940	16,61	16,70	1020	6,42
camphène	13,40	953	0,80	0,81	1065	7,84
<b>sabinène</b>	<b>15,00</b>	<b>976</b>	<b>37,11</b>	<b>37,11</b>	<b>1123</b>	<b>10,14</b>
$\beta$ -pinène	15,11	978	3,45	3,56	1107	9,43
myrcène	16,24	992		4,45	1168	12,40
p-cymène	18,22	1026	1,02	1,03	1275	17,89
limonène	18,52	1032	3,70	3,41	1193	13,87
$\beta$ -phellandrène	18,52	1032		0,37	1200	14,30
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimène	19,32	1046	0,74	0,75	1242	16,20
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	19,99	1058	0,24	0,25		17,10
$\gamma$ -terpinène	20,57	1067	1,00	1,01	1247	16,48
linalol	23,48	1112	0,67	0,68	1553	34,81
bornéol	27,72	1168	0,04		1695	42,80
terpin-1-én-4-ol	28,54	1178	1,78	1,77	1590	37,34
$\alpha$ -terpinéol	29,48	1189	0,18		1695	42,80
acétate de bornyle	35,86	1293	2,78	2,81	1570	35,92
acétate de géranyle	42,29	1386	12,23	12,43	1758	46,26
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	1,41	1,46	1579	36,55
$\alpha$ -humulène	46,19	1452	0,17		1668	41,37
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesène	46,70	1462	0,59	0,86	1668	41,37
$\gamma$ -muurolène	47,47	1475	0,73	0,93	1676	41,79
germacrène-D	47,87	1482	1,30	1,51	1695	42,80
bisabolène- $\beta$	49,68	1513	1,27	1,36	1723	44,29
non identifié	81,25	2139	0,58			
<b>Total identifié:</b>			<b>88,72</b>	<b>93,79</b>		

## Huile essentielle de *Solidago puberula*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4840

Aspect physique: jaune pâle

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
$\alpha$ -thujène	11,9	929	0,05	0,03	1025	6,57
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>12,60</b>	<b>940</b>	<b>25,04</b>	<b>24,91</b>	<b>1019</b>	<b>6,40</b>
camphène	13,41	953	1,38	1,36	1064	7,82
$\beta$ -pinène	15,11	978	6,16	6,13	1106	9,41
sabinène	14,99	976	0,53	0,52	1122	10,10
myrcène	16,25	992	9,98	9,91	1168	12,38
$\alpha$ -phellandrène	16,92	1001	0,43	0,41	1163	12,15
p-cymène	18,23	1026	0,15	0,14	1274	17,86
limonène	18,53	1032	11,79	10,63	1193	13,85
$\beta$ -phellandrène	18,53	1032		0,37	1200	14,27
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	20,00	1058	1,50	1,54	1259	17,08
terpinolène	22,56	1098	0,14	0,13	1286	18,53
linalol	23,49	1112	0,15	0,15	1553	34,79
acétate de bornyle	35,87	1293	1,99	2,02	1570	35,91
$\alpha$ -copaène	41,54	1376	0,31	0,32	1486	30,63
$\beta$ -cubébène	42,47	1388	0,17	0,22	1533	33,50
$\beta$ -élémane	42,61	1390	1,16		1576	36,54
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	4,39	5,41	1579	36,54
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	45,32	1437	0,89	0,96	1576	36,35
non identifié	47,69	1479	0,53			
$\alpha$ -humulène	46,20	1453	3,72	3,70	1652	40,57
germacrène D	47,88	1482	17,36	17,30	1696	42,81
bicyclogermacrène	48,81	1498	2,80	2,42	1720	44,13
$\alpha$ -muurolène	49,27	1506	0,70	0,50	1716	43,90
germacrène A	49,11	1503	0,60		1720	45,66
$\gamma$ -cadinène	49,85	1516	0,54		2353	45,66
$\delta$ -cadinène	50,45	1526	2,10	3,19	1747	45,66
longipinalol	54,88	1596	0,27			
$\zeta$ -muurolol	57,02	1638	0,52	0,26	2170	66,63
$\alpha$ -cadinol	57,68	1651	0,46	0,42	2211	68,55
<b>Total identifié:</b>			<b>96,38</b>	<b>94,15</b>		

## Huile essentielle d'*Artemisia vulgaris*

Provenance: Chicoutimi, Val Lomberette.

Date: 29 juin 2006

Identification	DB-5			Spwax		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
santolinatriène	11,48	917	0,42	0,42	1038	6,95
$\alpha$ -pinène	12,82	940	0,13	0,13	1020	6,42
sabinène	15,23	976	1,23	1,24	1123	10,15
myrcène	16,49	992	0,45	0,46	1168	12,42
$\alpha$ -phellandrène	17,18	1001	6,92	6,95	1164	12,19
non identifié	17,51	1007	0,18	0,17	1328	21,00
o-cymène	18,48	1026	1,39	1,40	1276	17,93
1,8-cinéole	18,87	1033	1,94	1,89	1199	14,24
<i>trans</i> - $\beta$ -ocymène	20,27	1057	0,59	0,58	1260	17,13
artemisia ketone	20,85	1067	0,26	0,26	1248	16,50
p-mentha-1,3,8-triène	24,71	1125	0,29	0,29	1384	24,83
camphre	26,38	1147	0,20	0,20	1506	31,78
<i>cis</i> -chrisanthenol	27,93	1167	0,62	0,53	1487	30,66
$\alpha$ -terpinéol	29,72	1188	0,17		1459	42,48
<b>acétate de <i>cis</i>-chrisanthenyl</b>	<b>34,62</b>	<b>1267</b>	<b>34,85</b>	<b>34,88</b>	<b>1566</b>	<b>35,63</b>
$\alpha$ -longipinène	40,20	1352	0,87	0,99	1459	29,08
eugénoï	40,64	1358	0,12	0,18	2156	66,03
$\alpha$ -copaène	41,90	1376	0,54	0,52	1487	30,66
$\beta$ -bourbonène	42,42	1383	0,18	0,16	1512	32,18
$\beta$ -élémente	42,96	1390	0,12	0,20	1591	37,36
$\beta$ -caryophyllène	44,51	1415	4,79	4,97	1580	36,60
$\alpha$ -humulène	46,56	1453	1,52	1,58	1653	40,62
<i>trans</i> - $\beta$ -fanésène	47,05	1461	0,25	0,24	1664	41,18
$\beta$ -chamigrène	47,96	1478	0,28			
<b>germacrène D</b>	<b>48,26</b>	<b>1483</b>	<b>23,77</b>	<b>24,07</b>	<b>1697</b>	<b>42,48</b>
$\gamma$ -himalalène	48,37	1485	3,14	3,56	1709	43,55
$\beta$ -sélinène	48,51	1487	1,27	1,24	1704	43,30
bicyclogermacrène	49,16	1498	1,57	1,54	1720	44,19
germacrène A	49,33	1501	0,13	0,14	1762	46,55
$\alpha$ -farnésène	49,63	1506	0,83		1747	45,67
$\beta$ -curcumène	50,09	1514	0,27	2,02	1747	45,67
$\gamma$ -cadinène	50,20	1516	0,11		1747	45,67
$\delta$ -cadinène	50,81	1526	0,48		1747	45,67
<i>trans</i> -nérolidol	53,18	1564	0,18	0,17	2042	60,73
spathulenol	53,67	1572	1,03	0,29	2110	63,82
germacradienol?	53,89	1575	0,20			
caryophyllène oxide	53,99	1577	0,40	0,36	1958	56,61
Non identifié	80,55	2114	1,87	2,05	2606	85,08
<b>Total identifié:</b>			<b>93,56</b>	<b>93,68</b>		

## Huile essentielle de *Ledum Groenlandicum*

Provenance: Aliksir, Québec

Date: 15 septembre 2005

Indice de réfraction (20°C): 1,4877

Aspect physique: jaune pâle

IDENTIFICATION	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
$\alpha$ -thujène	12,26	934	0,49	0,64	1027	6,61
$\alpha$ -pinène	12,59	940	7,55	7,52	1020	6,41
camphène	13,40	953	1,01	0,97	1065	7,83
sabinène	14,99	976	5,13	5,08	1123	10,12
$\beta$ -pinène	15,10	977	6,35	6,33	1107	9,42
myrcène	16,24	992	0,61	0,63	1168	12,39
non identifié	16,95	1002	0,93	0,66	1213	14,83
$\alpha$ -terpinène	17,73	1017	1,63	1,62	1177	12,86
non identifié				1,19	1251	16,61
p-cymène	18,22	1026	3,91	2,72	1275	17,88
limonène	18,52	1032	9,11	8,45	1193	13,86
$\beta$ -phellandrène	18,52	1032		0,67	1200	14,29
$\gamma$ -terpinène	20,57	1067	4,81	4,83	1248	16,47
p-cyménène	22,56	1098	1,32	0,43	1434	27,77
<i>trans</i> -p-mentha-2(8), 8-diène-1-ol	24,71	1129	0,18	0,40	1625	39,21
<i>trans</i> -pinocarvéol	25,84	1144	1,00	1,12	1644	40,15
terpinolène	22,56	1098		0,92	1287	18,54
terpin-1-èn-4-ol	28,54	1178	4,67	4,79	1590	37,33
<i>trans</i> -p-mentha-1(7), 8-diène-2-ol	29,28	1187	1,69	1,68	1789	48,08
$\alpha$ -terpinéol	29,48	1189	0,44	0,88	1694	42,75
myrténal	29,69	1192	1,23	1,46	1606	38,28
non identifié				1,12	1684	40,15
dihydrocarvacol	29,86	1194	0,45	0,67	1767	46,77
isopipériténoI	30,14	1197	0,38	1,47	1747	45,63
isopipériténoII	31,41	1218	0,41	0,34	1750	45,82
<i>trans</i> -carvécol	31,41	1218		0,32	1829	50,10
<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-diène-2-ol	31,97	1228	1,63	1,68	1885	52,78
carvone	32,95	1245	0,61	0,43	1731	44,75
acétate de Bornyle	35,86	1293	2,04	2,06	1570	35,91
$\beta$ -élémente	42,61	1390	1,23	1,85	1579	36,54
$\alpha$ -gurjumène	43,61	1405	0,83	0,86	1522	32,78
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	0,61		1579	36,54
$\alpha$ -humulène	46,20	1453	2,30	2,33	1652	40,56
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	46,70	1462	0,59	0,40	1668	41,36
germacrène-D	47,87	1482	0,42	0,88	1694	42,75
<b><math>\beta</math>-sélinène</b>	<b>48,15</b>	<b>1487</b>	<b>11,61</b>	<b>11,53</b>	<b>1704</b>	<b>43,24</b>
$\alpha$ -sélinène	48,70	1497	8,24	8,33	1710	43,58

curzérène?	48,97	1501	0,36			
germacrène A	49,27	1506	0,25	0,21	1757	46,20
$\beta$ -bisabolène	49,68	1513	3,44	3,63	1723	44,28
$\gamma$ -cadinène	49,98	1518	0,19		1747	45,63
$\gamma$ -cadinène 2 ?	47,49	1476	0,34			
$\delta$ -cadinène	50,45	1526	0,71	0,00	1747	45,63
germacrène B	52,21	1554	1,82	1,88	1805	48,99
non identifié	55,08	1599	0,87			
cis-apritone?	59,78	1693	1,05	0,65	2106	63,56
germacrone ?	59,78	1693				
cyclocolorénone	63,01	1753	0,86	0,91	2329	73,49
non identifié	64,55	1781	0,64	0,53	2452	79,19
<b>Total identifié:</b>			<b>93,90</b>	<b>94,54</b>		

## Huile essentielle d'*Achillea millefolium*

Provenance: Péribonka, Québec

Date: 14 août 2006

Identification	DB-5			Supelcowax 10		
	TR (min)	IK	%	%	IK	TR (min)
tricyclene	12,11	928	0,10	0,10	1002	5,94
$\alpha$ -pinene	12,82	940	1,26	1,27	1018	6,38
camphene	13,63	953	2,54	2,55	1064	7,80
sabinene	15,23	976	3,86	3,89	1122	10,09
$\beta$ -pinene	15,36	977	3,65	3,69	1105	9,39
myrcene	16,49	992	2,81	2,80	1167	12,36
$\alpha$ -phellandrene	17,17	1001	0,38	0,37	1163	12,12
cineol-1,4	17,99	1017	0,12	0,11	1176	12,86
<i>o</i> -cymene	18,48	1026	0,66	0,66	17,84	12,74
limonene	18,79	1031	1,24	1,19	1192	13,82
cineol-1,8	18,87	1033	2,05	2,10	1198	14,18
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimene	20,27	1057	0,25	0,25	1259	17,05
$\gamma$ -terpinene	20,85	1067	1,43	1,43	1247	16,43
<i>trans</i> sabinene hydrate	21,32	1075	0,36	0,37	1467	29,56
terpinolene	22,84	1098	0,14	0,14	1286	18,50
$\alpha$ -thujone	24,64	1124	4,63	4,67	1431	27,62
camphre	26,39	1148	9,25	9,31	1504	31,70
chrysanthemyl alcool?	27,92	1167	1,76		1695	42,79*
isopulegol?	28,80	1177	0,26	0,25	1591	37,35
$\alpha$ -terpineol	29,72	1188	0,33		1695	42,79*
bornyl acetate	36,15	1292	2,25	2,25	1570	35,91
$\alpha$ -copaene	41,90	1376	0,10	0,10	1485	30,57
$\beta$ -caryophyllene	44,51	1415	3,40	3,44	1579	36,49
$\alpha$ -humulene	46,56	1453	0,55	0,56	1651	40,52
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesene	47,05	1461	0,79	0,80	1667	41,33
<b>germacrene D</b>	<b>48,26</b>	<b>1483</b>	<b>21,40</b>	<b>23,43</b>	<b>1695</b>	<b>42,79*</b>
bicyclogermacrene	49,17	1498	1,04	1,00	1719	44,09
germacrene A	49,34	1501	0,50	0,50	1746	45,61
$\alpha$ -zingiberene	49,46	1503	0,16	0,14	1715	43,86
$\alpha$ -farnesene	50,10	1514	3,89	3,90	1749	45,79
<i>cis</i> -nerolidol	51,46	1537	0,27	0,37	2022	59,87
non identifié	52,22	1549	0,88	0,96	2070	62,00
<i>trans</i> -nerolidol	53,19	1564	0,66	0,63	2040	60,66
germacrene-D-4-ol	53,66	1572	0,42	0,58	2032	60,30
germacradienol	53,99	1577	0,61			
humulene epoxide I?	55,13	1594	0,39	0,37	2034	60,37
epi- $\gamma$ -eudesmol	55,95	1609	0,13	0,14	2154	65,94

$\gamma$ -eudesmol	56,76	1626	0,52	0,49	2135	65,00
$\zeta$ -muurolol	57,40	1639	0,44	0,51	2167	66,53
$\zeta$ -cadinol	57,57	1642	0,21	0,13	2158	66,10
non identifié	57,74	1646	3,28			
$\alpha$ -bisabolol oxide B	57,74	1646		0,28	2124	64,48
$\alpha$ -muurolol	57,89	1649	0,56	0,49	2196	67,98
$\beta$ -eudesmol	58,02	1651	0,34	0,54	2210	68,59
$\alpha$ -eudesmol	58,49	1660	0,39	0,20	2224	69,16
$\alpha$ -cadinol?	58,66	1664	1,39	2,36	2216	68,81
non identifié	58,83	1667	2,32	2,89	2232	69,47
$\alpha$ -bisabolol	59,65	1683	0,99		2216	68,81
farnesol?	60,87	1707	0,28	0,34	2337	73,95
chamazulene	61,81	1724	8,79	9,73	2359	74,89
<b>Total identifié:</b>			<b>94,03</b>	<b>92,28</b>		

## Huile essentielle d'*Echinacea purpurea*

Provenance: Aliksir, Québec

Aspect physique: liquide teinté vert

Indice de réfraction (20 °C): 1,5065

Identification	Colonne DB-5			Colonne Supelcowax 10		
	T.R.	I.K.	%	%	I.K.	T.R.
$\alpha$ -pinène	12,60	940	0,48	0,48	1019	6,39
sabinène	14,99	976	0,06	0,06	1122	10,10
$\beta$ -pinène	15,11	978	0,16	0,15	1106	9,40
myrcène	16,25	992	3,95	3,92	1168	12,37
$\alpha$ -phellandrène	16,92	1001	0,28	0,27	1164	12,14
para-cymène	18,23	1026	0,05	0,05	1275	17,86
limonène	18,53	1032	0,50	0,47	1193	13,83
$\beta$ -phellandrène	18,53	1032		0,04	1200	14,27
terpin-1-én-4-ol	28,54	1178	0,03	0,04	1590	37,33
acétate de bornyle	35,86	1293	0,04	0,05	1570	35,91
$\alpha$ -copaène	41,54	1376	0,27	0,27	1486	30,62
$\beta$ -élémane	42,61	1390	0,34		1579	36,54
$\beta$ -caryophyllène	44,16	1415	2,65	2,94	1579	36,54
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	45,32	1436	0,33	0,45	1576	36,35
$\alpha$ -humulène	46,20	1453	1,10	1,09	1652	40,57
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	46,76	1463	0,17	0,04	1668	41,38
germacrène D	47,97	1483	72,63	71,92	1697	42,92
$\beta$ -sélinène	48,20	1487	0,32	0,22	1704	43,31
bicyclogermacrène	48,81	1499	2,16	1,74	1720	44,14
$\alpha$ -sélinène	48,81	1499		0,27	1707	43,44
germacrène A	49,11	1503	0,48		1747	45,67
$\alpha$ -muurolène	49,28	1506	0,37	0,46	1715	43,90
E,E- $\alpha$ farnésène	49,75	1514	0,73	0,71	1750	45,83
$\gamma$ -cadinène	49,85	1515	0,41		1747	45,67
$\delta$ -cadinène	50,46	1525	1,72	2,49	1747	45,67
germacrène B	52,22	1554	0,83	0,87	1805	49,00
<i>trans</i> -nérolidol	52,87	1564	1,26	1,31	2041	60,65
germacrène-D-4-ol	53,32	1571	0,36	0,34	2035	60,37
oxyde de caryophyllène	53,67	1577	0,13	0,09	1957	56,52
Non identifié	55,60	1608	0,41	0,35	2123	64,37?
$\zeta$ -cadinol	57,02	1637	1,22	0,41	2156	65,95
$\zeta$ -muurolol	57,02	1637		0,89	2171	66,65
$\alpha$ -cadinol	57,69	1651	1,53	1,49	2212	68,57
non identifié	59,54	1687	0,51	0,38	2303	72,39?
<b>Total identifié:</b>			<b>95,48</b>	<b>94,26</b>		

## Huile essentielle d'*Hypericum perforatum*

Provenance: Aliksir, Québec

Aspect physique: liquide incolore

Indice de réfraction (20 °C): 1,4506

Identification	Colonne DB-5			Colonne Supelcowax 10		
	T.R.	I.K.	%	%	I.K.	T.R.
<b>2-méthyl-octane</b>	<b>9,07</b>	<b>873</b>	<b>27,16</b>	<b>26,71</b>	<b>864</b>	<b>3,21</b>
nonane	10,84	910	2,56	2,54	899	3,75
$\alpha$ -thujène	12,27	935	0,48	0,67	1026	6,59
$\alpha$ -pinène	12,60	940	18,22	18,13	1019	6,39
camphène	13,41	953	0,12	0,10	1066	7,81
3-méthyl-nonane	15,00	976	3,55	3,18	965	5,03
sabinène	15,00	976		0,36	1122	10,09
$\beta$ -pinène	15,12	977	12,18	13,04	1106	9,41
myrcène	16,24	992	1,18	1,13	1169	12,37
$\alpha$ -terpinène	17,73	1017	0,13	0,13	1177	12,87
para-cymène	18,23	1026	0,36	0,36	1275	17,86
limonène	18,52	1031	2,12	1,41	1193	13,83
$\beta$ -phellandrène	18,52	1031		0,74	1200	14,27
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimène	19,33	1046	0,34	0,33	1242	16,17
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène	20,00	1058	1,75	1,76	1257	17,07
$\gamma$ -terpinène	20,58	1067	0,36	0,33	1248	16,44
3-méthyl-décane ?	21,15	1077	2,32	2,32	1061	7,70
terpinolène	22,56	1099	0,18	0,15	1288	18,52
undécane	23,59	1114	0,90		1106	9,41
terpin-1-én-4-ol	28,54	1178	0,29	0,32	1590	37,34
$\alpha$ -terpinéol	29,48	1189	0,18		1695	42,81
2-méthyl-dodécane?	34,65	1273	0,62	0,62	1266	17,44?
acétate de bornyle	35,87	1293	0,16	0,18	1570	35,92
tridécane	37,02	1310	0,15	0,15	1311	19,92
$\alpha$ -ylangène	41,27	1372	0,14	0,14	1477	30,13
$\alpha$ -copaène	41,54	1375	0,32	0,26	1486	30,62
$\beta$ -bourbonène	42,06	1382	0,15	0,21	1511	32,15
$\beta$ -funébrène?	43,69	1406	0,45	0,36	1705	43,32?
$\beta$ -caryophyllène	44,16	1415	3,96	3,82	1579	36,54
$\beta$ -copaène	44,77	1426	0,26	0,26	1586	37,08?
$\alpha$ -humulène	46,20	1452	0,29	0,31	1652	40,57
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	46,71	1461	1,17	0,88	1667	41,37
alloaromadendrène	46,71	1461		0,13	1628	39,21
$\gamma$ -muurolène	47,69	1478	1,25	1,43	1677	41,86
germacrène D	47,88	1482	3,64	3,69	1695	42,81
non identifié	48,01	1484	1,11			
bicyclogermacrène	48,76	1497	0,92	0,37	1720	44,13
$\alpha$ -sélinène?	48,76	1497		1,22	1708	43,49
(E,Z)- $\alpha$ -farnésène	49,01	1501	0,48	0,28	1730	44,68?

$\alpha$ -muurolène	49,11	1503	0,42	0,40	1715	43,90
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	49,76	1514	0,29	0,32	1750	45,83?
$\gamma$ -cadinène	49,85	1515	0,81		1747	45,66
$\delta$ -cadinène	50,46	1525	1,82	2,46	1747	45,66
<i>trans</i> -nérolidol	52,87	1564	0,18	0,18	2041	60,65
spathuléol	53,39	1572	0,34	0,38	2109	63,74
oxyde de caryophyllène	53,66	1576	0,68	0,49	1957	56,53
globulol?	53,66	1576		0,06	2037	60,45
$\zeta$ -cadinol	57,02	1637	0,23	0,10	2156	65,95
non identifié	57,02	1637				
$\zeta$ -muurolol	57,17	1640	0,46	0,42	2172	66,72
$\alpha$ -cadinol	57,69	1651	0,19	0,25	2212	68,58
<b>Total identifié:</b>			<b>94,87</b>	<b>93,08</b>		

## Huile essentielle d'*Acorus calamus*

Provenance: Aliksir, Québec

Aspect physique: jaune

Indice de réfraction (20°C): 1,4990

Identification	Colonne DB-5			Colonne Supelcowax 10		
	T.R.	I. K.	%	%	I. K.	T.R.
$\alpha$ -pinène	12,59	940	0,07	0,07	1020	6,39
camphène	13,41	953	0,08	0,09	1065	7,81
limonène	18,53	1032	0,02	0,02	1193	13,83
acétate de bornyle	35,86	1292	0,35	0,37	1569	35,90
$\beta$ -élémente	42,61	1390	0,24	0,30	1579	36,53
$\beta$ -funébrène	43,74	1407	1,07	0,86	1567	35,76
7-epi- $\alpha$ -cédrène	43,74	1407		0,08	1500	31,46?
$\beta$ -cédrène	44,13	1414	0,55		1576	36,36
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	45,31	1436	0,45	1,01	1576	36,36
isomère du prézizaène	45,97	1448	1,00	0,89	1611	38,58
isoeugéno-(E)	45,97			0,15	2334	73,71
<i>trans</i> - $\beta$ -farnésène	46,71	1461	0,87	0,52	1667	41,35
$\gamma$ -curcumène	47,94	1483	0,19	0,14	1685	42,27
$\alpha$ -curcumène	48,14	1486	0,65	0,20	1767	46,80
$\alpha$ -séliène	48,14	1486		0,55	1703	43,22
5-épi-aristolochène	48,28	1489	0,71	0,58	1713	43,76?
6-épi-shyobunone	48,64	1495	4,57	4,42	1839	50,58
$\beta$ -séliène	48,80	1498	0,82	0,18	1710	43,56
bicyclogermacrene	48,80	1498		0,31	1719	44,12
$\alpha$ -muuroloène	49,27	1506	0,14	0,10	1715	43,89
shyobunone	49,89	1516	18,76	16,18	1886	52,86
$\delta$ -cadinène	50,51	1526	1,58	1,04	1747	45,65
$\beta$ -sesquiphellandrène	50,51	1526		1,01	1762	46,49
isoshyobunone	50,76	1530	1,14	1,12	1866	51,87
<i>trans</i> -nérolidol	52,87	1564	1,25	2,77	2041	60,63
spathuléno	53,39	1572	0,86	0,57	2117	64,07
germacrène-D-4-ol	53,39	1572			2041	60,63
non identifié (MM = 220)	54,61	1591	0,52			
préisocalamendiol	54,99	1597	19,08	18,98	1998	58,73
m/e:41,192, 69, 81, 55,95 ... 220	56,25	1622	1,03	0,67	2094	63,02
m/e:138, 151, 68, 111, 95, ... 222	56,25	1622		0,54	2014	59,49
Non identifié	56,39	1624	0,55			
m/e: 138, 151, 111, 41 95, 55,... 222	57,04	1638	1,90		2041	60,63
$\zeta$ -muurolo	57,04	1638		0,38	2170	66,63
asarone	58,71	1650	0,47	0,43	2357	74,74
$\alpha$ -cadinol	57,68	1651	1,15	0,94	2211	68,56

4-épi-acorénone?	59,20	1681	0,53	0,56	2131	64,73
acorénone	59,47	1686	9,75	9,95	2157	65,98
khusiol	60,60	1708	0,19	0,26	2295	72,02
acora-7(11),9-dien-2-one ?	61,31	1721	0,50	0,45	2238	69,64
isocalamendiol	62,28	1739	5,62	6,10	2449	79,08
calamendiol ?	62,58	1745	0,57	0,45	2430	78,10
eudesma-3,11-dien-2-one ?	64,55	1781	0,27		2454	79,34
non identifié	65,13	1791	1,59	1,52	2454	79,34
crypto-acorone ?	65,44	1797	8,65	12,70	2524	82,89
iso-acorone	65,64	1800	0,65		2524	82,89
acorone	65,93	1807	0,44		2524	82,89
épi-acorone	66,45	1818	2,17		2524	82,89
<b>Total identifié:</b>			<b>91,00</b>	<b>87,46</b>		

## Huile essentielle de *Tsuga canadensis*

Provenance : Aliksir, Québec

Aspect physique: liquide incolore

Indice de réfraction (20°C): 1,469

Identification	Colonne DB-5			Colonne Supelcowax 10		
	T.R.	I.K.	%	%	I.K.	T.R.
santène	9,90	892	0,13	0,13	982	5,40
tricyclène	11,90	928	5,10	5,05	1005	5,95
$\alpha$ -thujène	12,27	935	0,14	0,20	1027	6,60
$\alpha$ -pinène	12,61	940	16,05	15,92	1019	6,40
camphène	13,41	953	13,28	13,16	1066	7,82
sabinène	14,99	976	0,05	0,05	1123	10,10
$\beta$ -pinène	15,11	977	1,86	1,85	1107	9,41
myrcène	16,25	992	2,67	2,65	1169	12,37
$\alpha$ -phellandrène	16,93	1001	0,60	0,58	1164	12,14
$\alpha$ -terpinène	17,74	1017	0,17	0,16	1177	12,87
p-cymène	18,23	1026	0,71	0,71	1275	17,86
limonène	18,53	1031	4,66	3,28	1193	13,84
$\beta$ -phellandrène	18,53	1031		1,38	1200	14,27
1,8-cinéole	18,67	1034	0,29	0,28	1198	14,16
$\gamma$ -terpinène	20,58	1067	0,24	0,24	1248	16,45
terpinolène	22,56*	1099	0,63	0,46	1288	18,53
linalol	23,49	1112	0,09	0,11	1553	34,80
bornéol	27,73	1168	0,49		1694	42,74
terpin-1-én-4-ol	28,55	1178	0,55	0,53	1590	37,33
$\alpha$ -terpinéol	29,49	1189	0,72	1,28	1694	42,74
pipéritone	33,62	1256	2,41	2,48	1711	43,67
<b>acétate de bornyle</b>	<b>35,92</b>	<b>1293</b>	<b>41,11</b>	<b>41,28</b>	<b>1570</b>	<b>35,95</b>
non identifié	38,81	1337	1,44	1,70	1682	40,56?
$\beta$ -caryophyllène	44,15	1415	0,99	1,00	1576	36,56
$\alpha$ -humulène	46,20	1452	1,39	1,46	1652	40,56
$\gamma$ -muurolène	47,69	1479	0,18	0,17	1677	41,85
germacrène D	47,88	1482	0,09		1694	42,74
$\alpha$ -muurolène	49,11	1503	0,10	0,06	1715	43,89
$\gamma$ -cadinène	49,86	1515	0,16		1747	45,66
$\delta$ -cadinène	50,46	1525	0,39	0,57	1747	45,66
<b>Total identifié:</b>			<b>96,69</b>	<b>96,74</b>		

**ANNEXE 2****SPECTRES RMN  $^1\text{H}$  ET  $^{13}\text{C}$  DES GLYCOSIDES D' $\alpha$ -BISABOLOL**

1H Xyl3OBzBis\_CDCl3

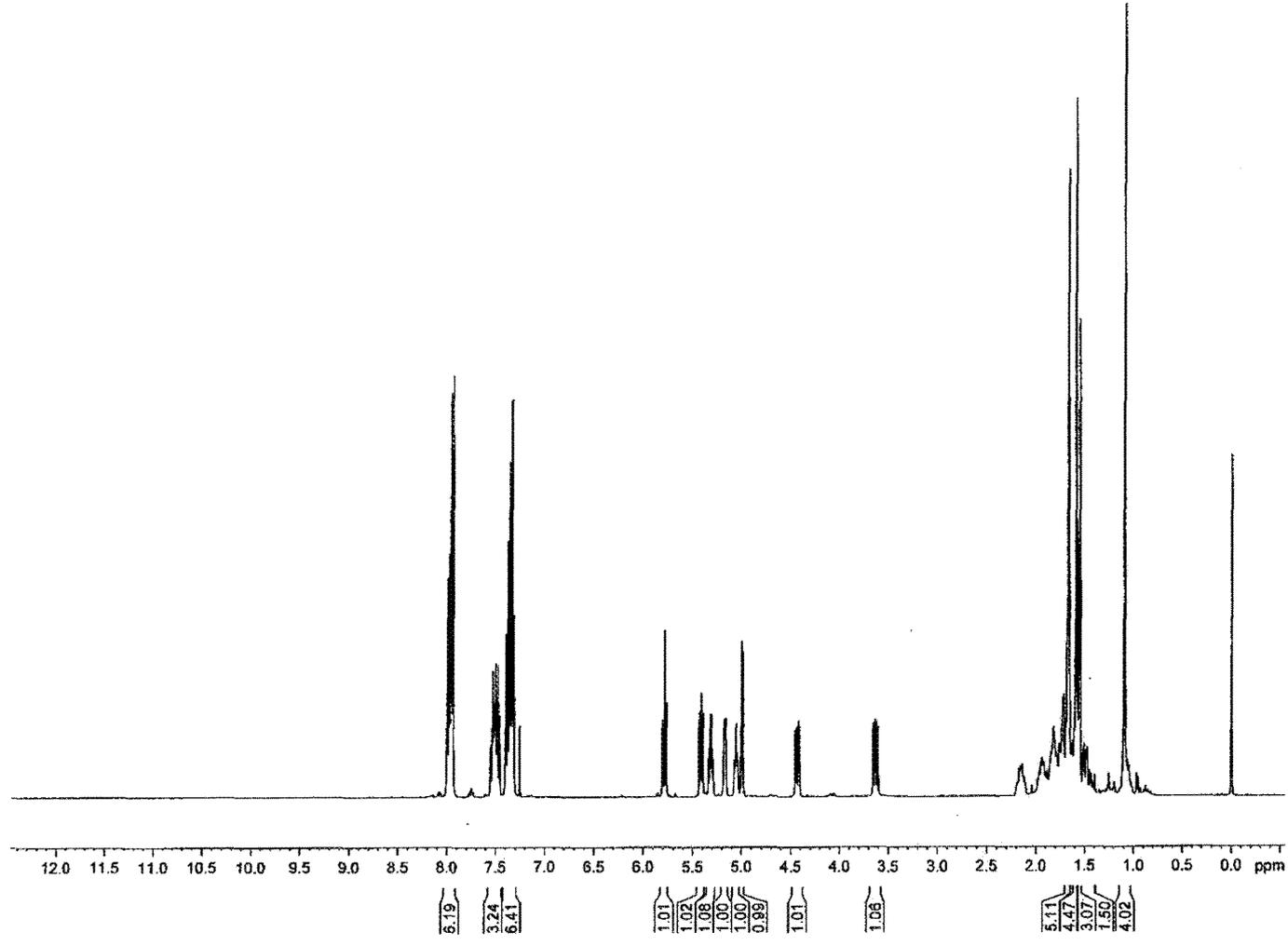


Current Data Parameters  
NAME XylBis3Br\_CDCl3  
EXPNO 1  
PROCNO 1

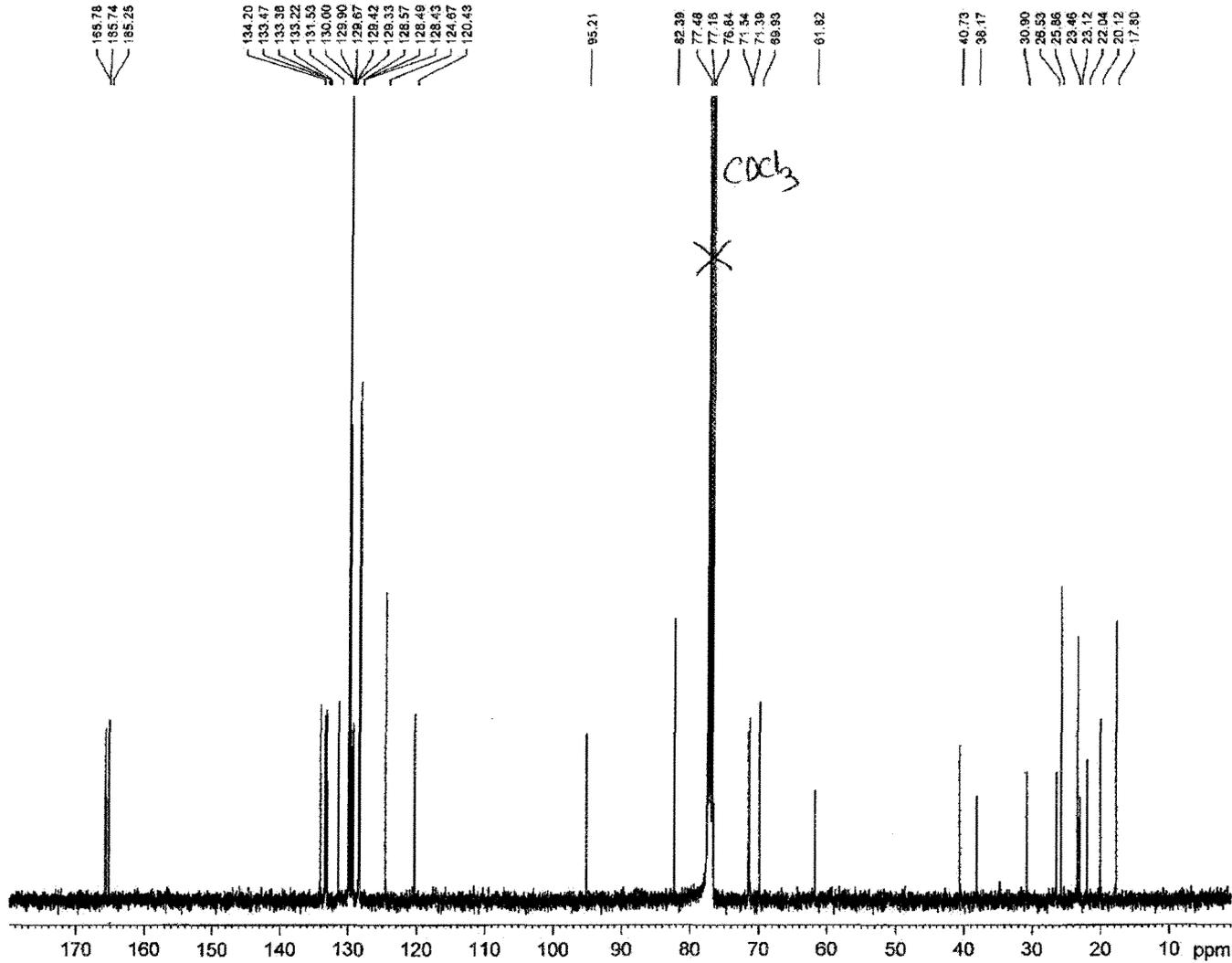
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20061109  
Time 14.30  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT MeOD  
NS 16  
DS 0  
SWH 5208.333 Hz  
FIDRES 0.168946 Hz  
AQ 3.1457779 sec  
RG 203.2  
DW 96.000 usec  
DE 9.00 usec  
TE 0.0 K  
D1 1.00000000 sec  
MCREST 0.00000000 sec  
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324006 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1330174 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00



13C XylBis3OBz\_CDC13



Current Data Parameters  
 NAME XylBis3OBz\_CDC13  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061108  
 Time 18.12  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 85636  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 5120  
 DS 2  
 SWH 18125.941 Hz  
 FIDRES 0.276427 Hz  
 AQ 1.8088436 sec  
 RC 912.3  
 DW 27.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 DT 0.69999989 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

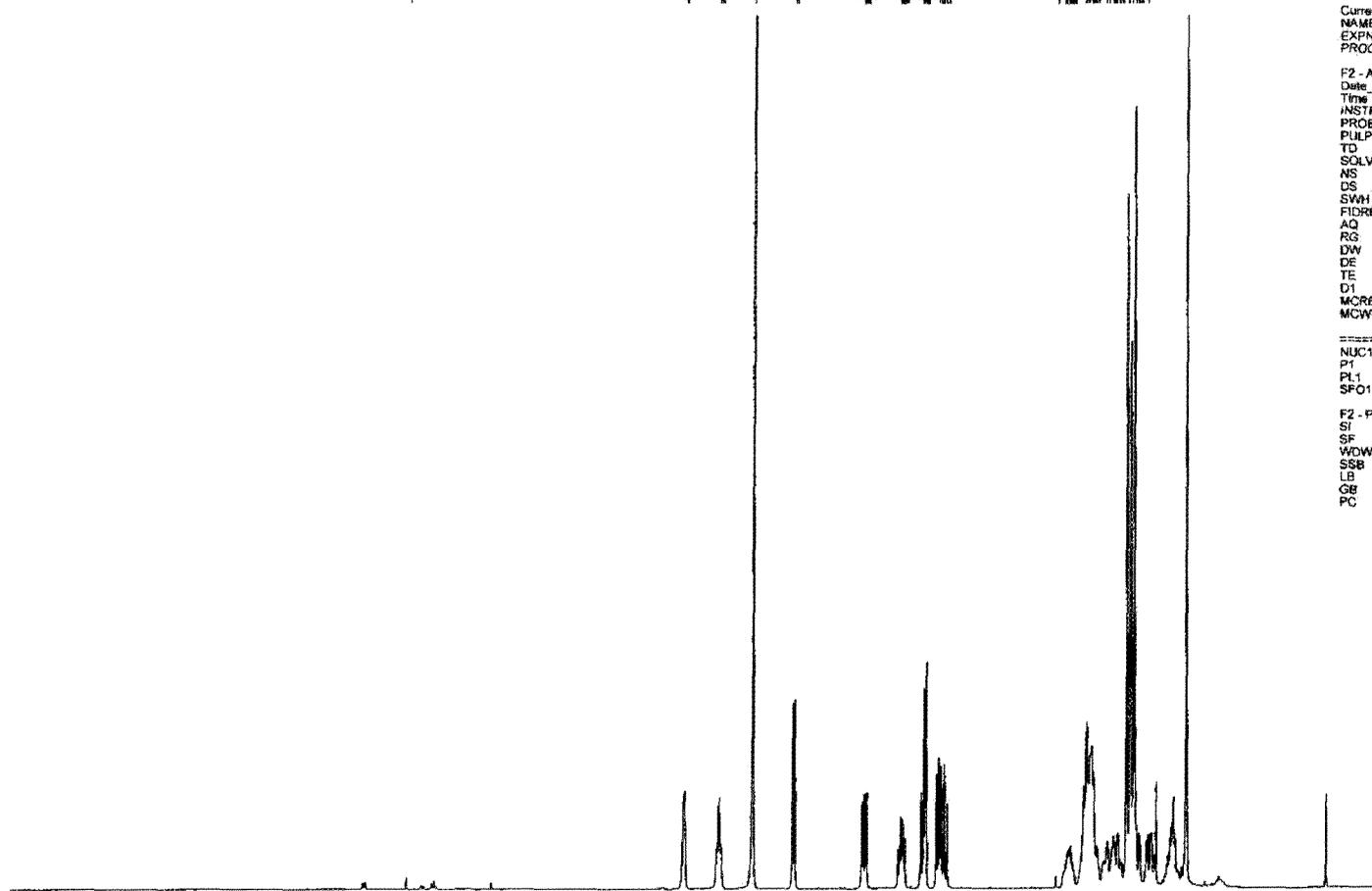
F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127572 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1H



7.599

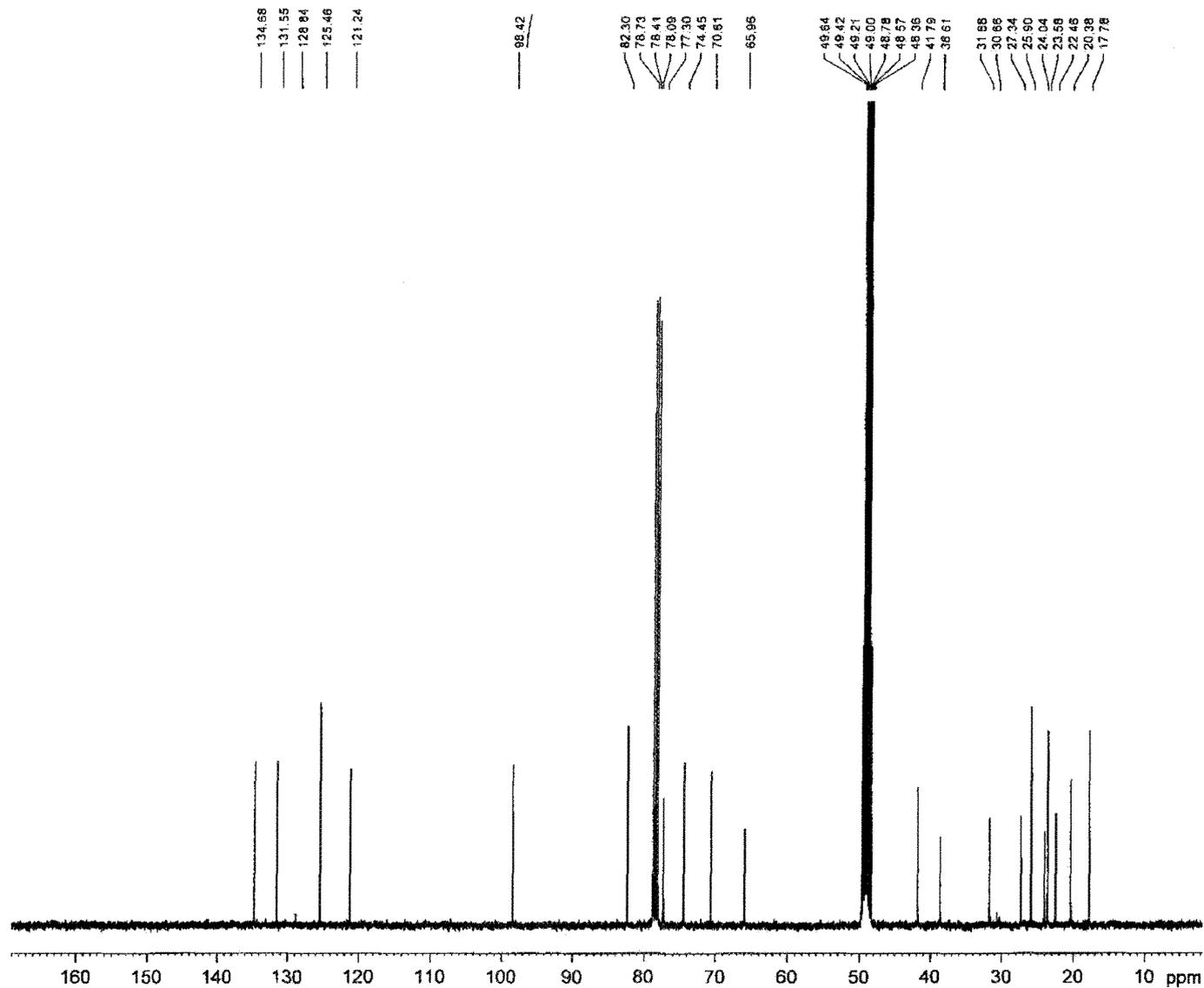
5.395  
 5.085  
 5.067  
 4.748  
 4.428  
 4.430  
 3.865  
 3.858  
 3.841  
 3.828  
 3.567  
 3.554  
 3.542  
 3.532  
 3.521  
 3.278  
 3.378  
 3.356  
 3.342  
 3.338  
 3.334  
 3.247  
 3.229  
 3.225  
 3.212  
 3.201  
 3.184  
 3.158  
 2.233  
 2.186  
 2.162  
 2.154  
 2.149  
 2.133  
 2.116  
 2.103  
 2.023  
 2.006  
 1.973  
 1.958  
 1.942  
 1.618  
 1.656  
 1.627  
 1.780  
 1.775  
 1.745  
 1.736  
 1.726  
 1.716  
 1.709  
 1.697  
 1.636  
 1.606  
 1.583  
 1.552  
 1.502



1.00  
 0.99  
 3.90  
 0.99  
 0.97  
 0.99  
 1.86  
 1.95  
 1.01  
 4.95  
 2.15  
 2.92  
 2.89  
 3.46  
 1.99  
 1.78  
 2.91

Current Data Parameters  
 NAME XyBis\_01\_MeOH\_CHCl3  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1  
  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061117  
 Time 10.48  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT MeOD  
 NS 16  
 DS 0  
 SWH 5208 333 Hz  
 FIDRES 0.158846 Hz  
 AQ 3.1457779 sec  
 RG 101 6  
 DQV 96.300 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 1.00000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec  
  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 11.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 SFO1 400.1324009 MHz  
  
 F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1299559 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

alpha-bisabolol xylopyranoside CDC13+MeOD 13C



Current Data Parameters  
 NAME XyBis\_01\_MeOH\_CHCIS  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061117  
 Time 16.08  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT MeOD  
 NS 2048  
 DS 2  
 SWH 18115.941 Hz  
 FIDRES 0.276427 Hz  
 AQ 1.8088436 sec  
 RG 23170.5  
 DW 27.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 0.69939998 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

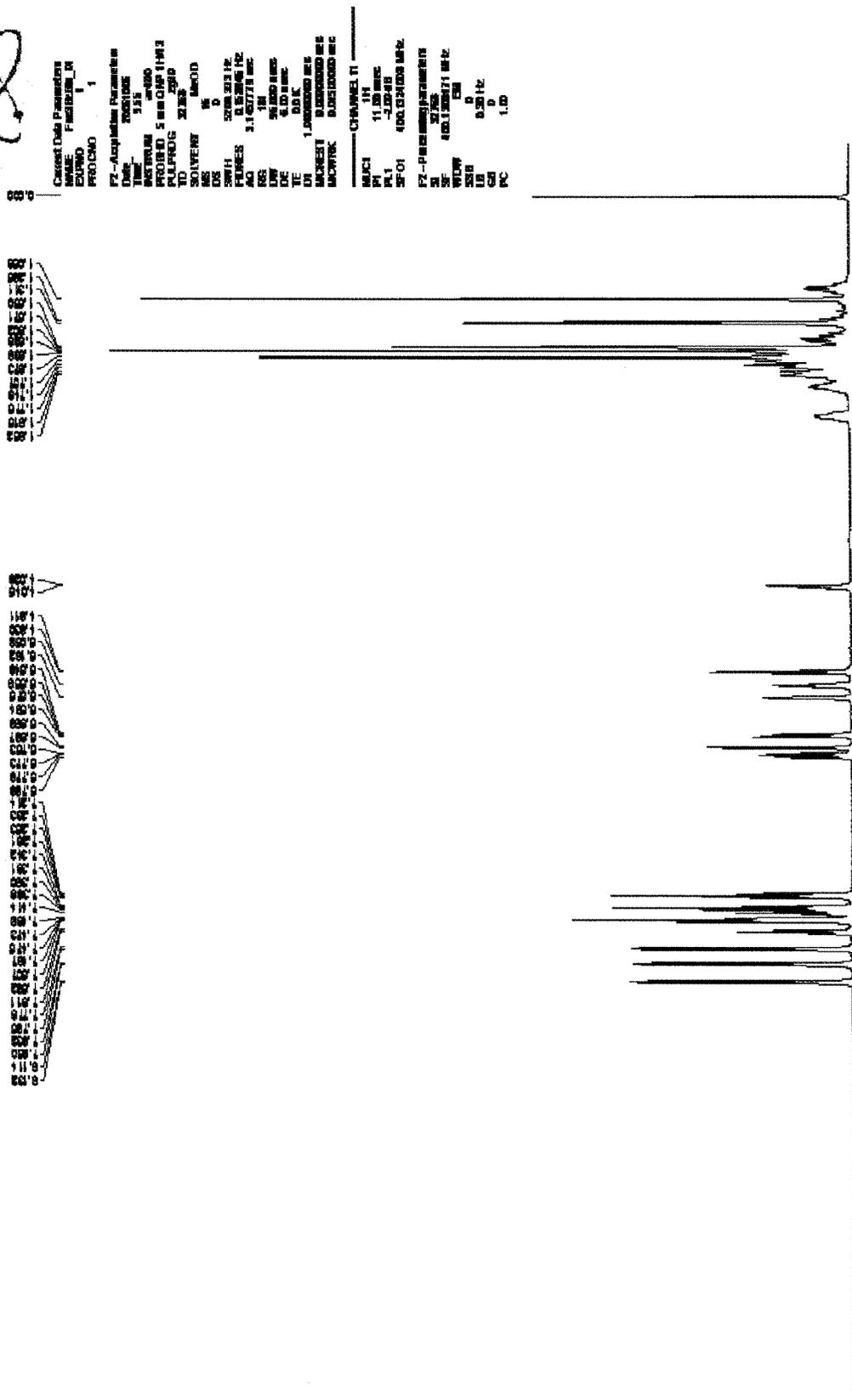
===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6126864 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40



1H Fuc30BzBis CDCl3

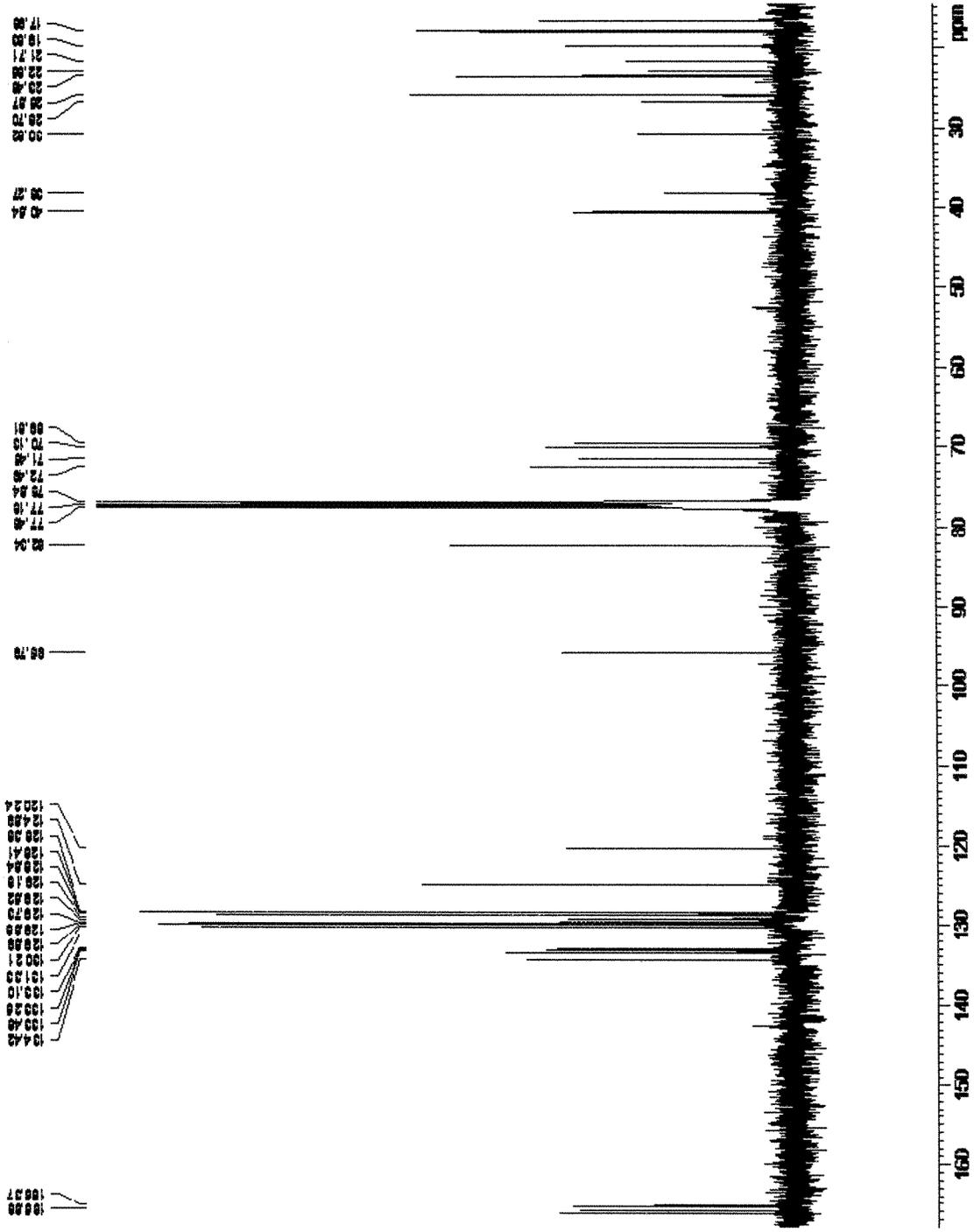


1.04  
 1.00  
 1.00  
 1.04  
 1.06  
 1.01



Current Data Parameters  
 NAME: Fmoc-Lys-D-Val-OMe  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20051006  
 Time: 11.23  
 INSTRUM: spect  
 PULPROG: zgpg30  
 XDPRG0: zgpg30  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 2048  
 DS: 4  
 SWH: 20032.00 Hz  
 FWHZ: 0.300000 Hz  
 AQ: 1.5012664 sec  
 RG: 327.5  
 LW: 24.000 MHz  
 DE: 4.000 MHz  
 TE: 300.2 K  
 D1: 0.50000000 sec  
 d11: 0.50000000 sec  
 ACCRET: 0.00000000 sec  
 SFO1: 0.00000000 sec  
 SFO2: 0.00000000 sec  
 CHANNEL f1  
 NUC1: 13C  
 P1: 10.000 sec  
 PL1: 0.000 dB  
 SFO1: 101.6228000 MHz  
 CHANNEL f2  
 NUC2: 1H  
 P2: 10.000 sec  
 PL2: -2.000 dB  
 SFO2: 500.1360000 MHz  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 100.6175000 MHz  
 WDW: EM  
 LB: 1.000 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00

13C



17.00  
16.00  
15.00  
14.00  
13.00  
12.00  
11.00  
10.00  
9.00  
8.00  
7.00  
6.00  
5.00  
4.00  
3.00  
2.00  
1.00

89.81  
79.10  
71.48  
72.48  
79.84  
77.16  
77.48  
82.04

88.78

152.24  
124.88  
138.38  
138.41  
138.84  
138.18  
138.82  
138.73  
138.88  
138.88  
139.21  
131.33  
133.10  
133.28  
133.48  
134.45

158.88  
158.87

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

alpha-bisabolol beta-D-fucopyranoside 1H



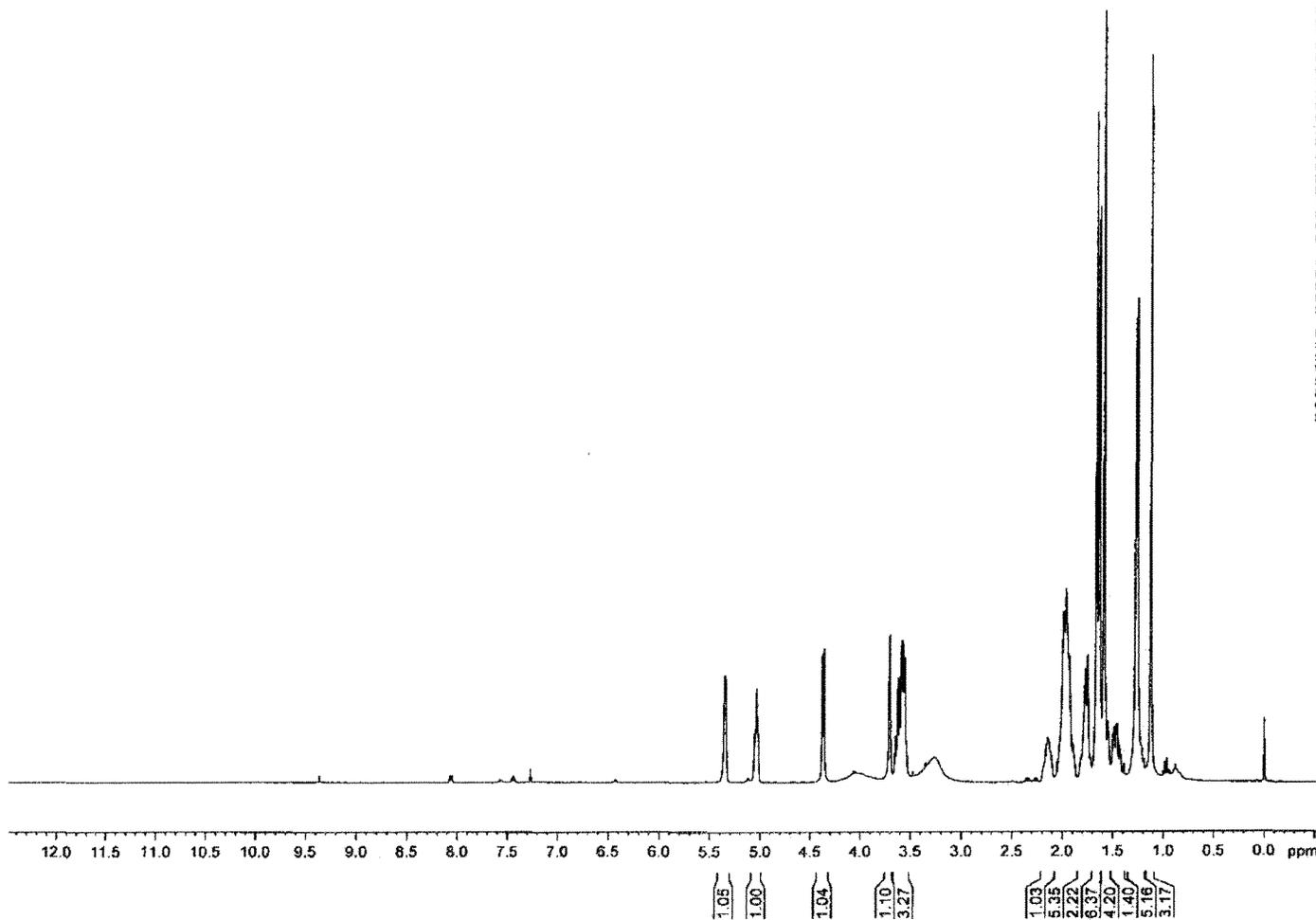
5.354  
5.056  
5.041  
5.025  
4.381  
4.343  
3.706  
3.652  
3.028  
3.610  
3.592  
3.686  
3.572  
3.557  
3.841  
2.146  
1.841  
2.116  
1.990  
1.958  
1.937  
1.895  
1.774  
1.751  
1.657  
1.641  
1.943  
1.903  
1.871  
1.801  
1.486  
1.466  
1.459  
1.435  
1.423  
1.279  
1.259  
1.128

Current Data Parameters  
NAME Fucas\_01\_odd3  
EXPNO 1  
PROCNO 1

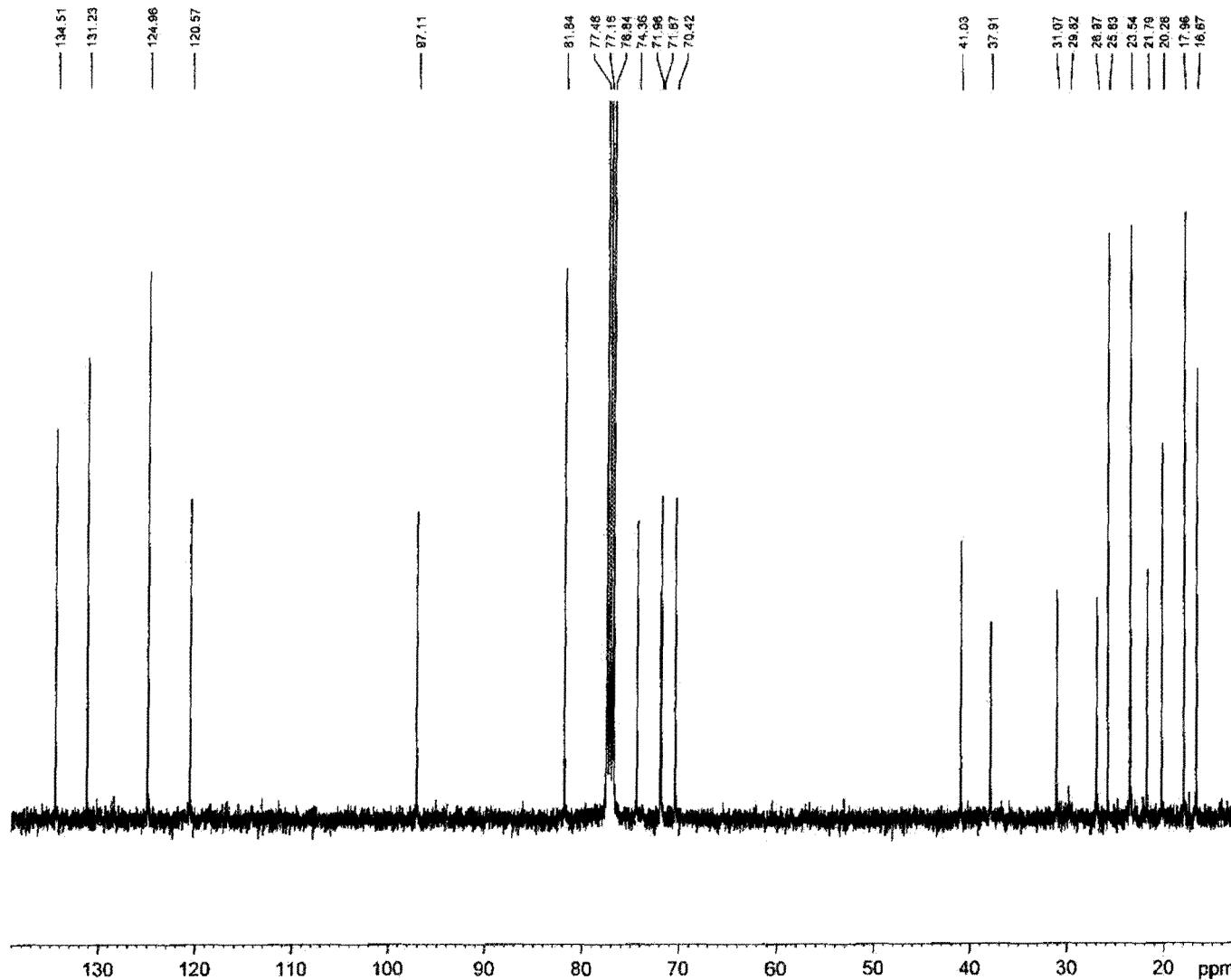
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20061012  
Time 9.43  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 1  
DS 0  
SWH 5208.333 Hz  
FIDRES 0.158946 Hz  
AQ 3.1457779 sec  
RG 64  
DW 96.000 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.0000000 sec  
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324006 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1300131 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00



alpha-bisabolol beta-D-fucopyranoside 13 C



```

Current Data Parameters
NAME   Fucbis_01_c1c13
EXPNO   2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20061012
Time     10.38
INSTRUM  sw400
PROBHD   5 mm QNP 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       2
SWH      16129.032 Hz
FIDRES   0.246110 Hz
AQ       2.0316660 sec
RG       1824.6
DW       31.000 usec
DE       5.00 usec
TE       0.0 K
D1       0.69999999 sec
d11      0.03000000 sec
MCREST   0.00000000 sec
MCWRK    0.01500000 sec

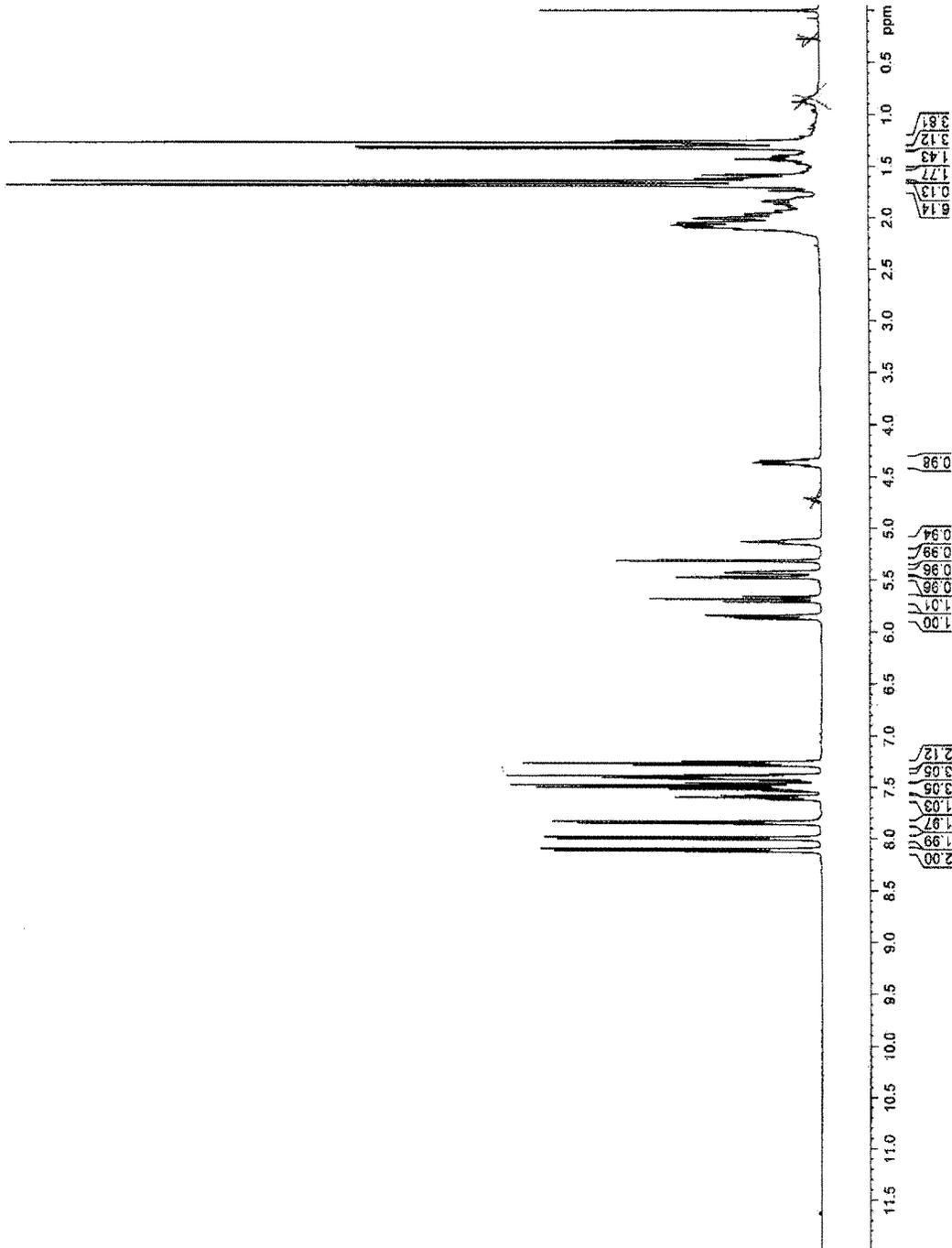
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PL1      0.00 dB
SFO1    100.6208180 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPOPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      -2.00 dB
PL12     15.23 dB
PL13     120.00 dB
SFO2    400.1315000 MHz

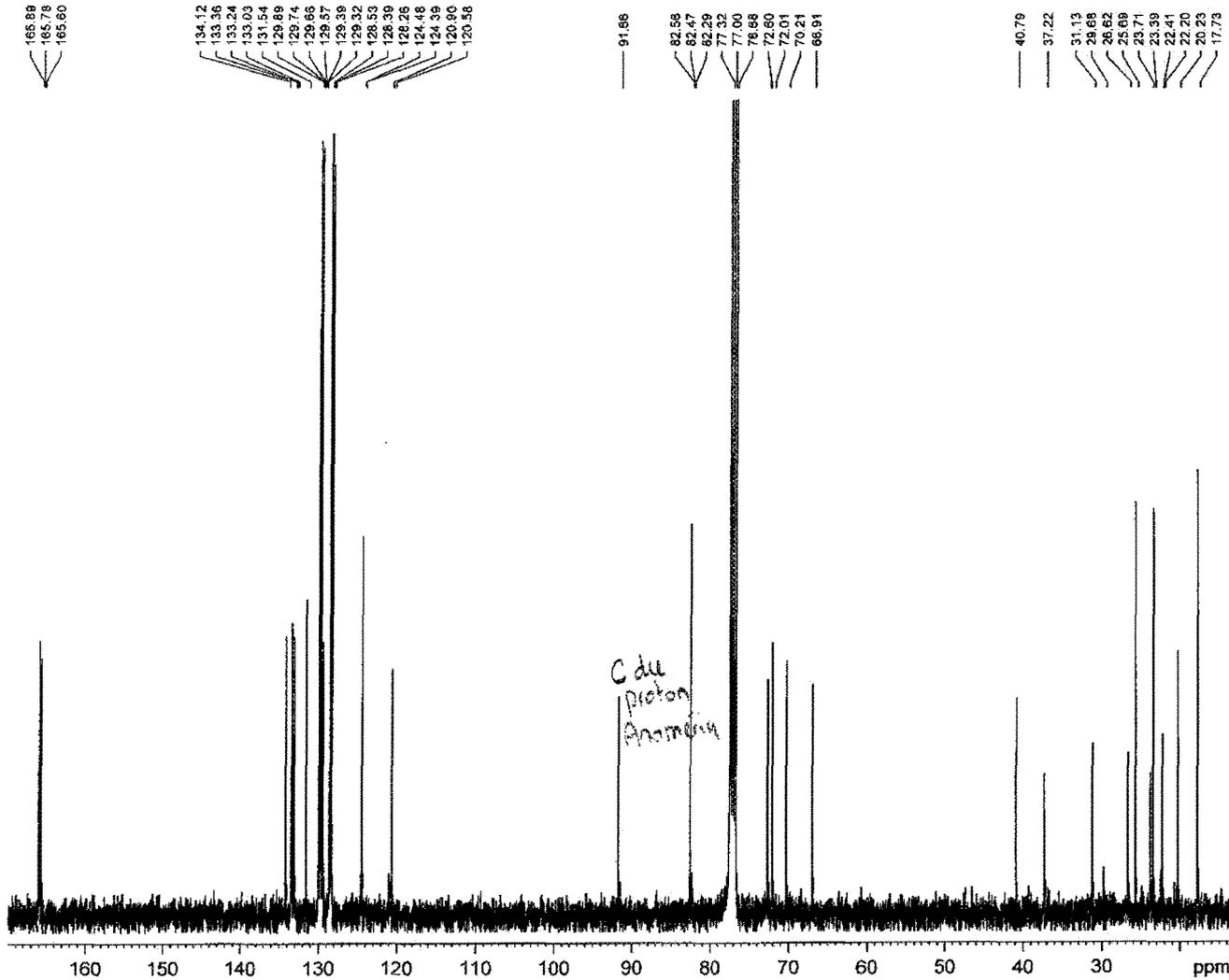
F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       100.6127594 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```



Current Data Parameters  
 NAME: Rha3BzBe\_01\_CDX  
 EXPNO: 1  
 PROCNO: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20081023  
 Time: 9.59  
 INSTRUM: spect  
 PROBHD: 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG: zg30  
 TD: 32768  
 SOLVENT: CDCl3  
 DS: 4  
 SC: 0  
 SWH: 5206.333 Hz  
 FIDRES: 0.156846 Hz  
 AQ: 3.142779 sec  
 RG: 384.000  
 DW: 38.000 usec  
 DE: 6.00 usec  
 TE: D.D.K  
 T1: 1.000000 sec  
 T2: 0.000000 sec  
 MCREST: 0.000000 sec  
 MCMTRK: 0.0150000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1: 13C  
 P1: 11.00 usec  
 PL1: -2.00 dB  
 SFO1: 400.1324099 MHz  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 400.1300180 MHz  
 SWH: 0  
 FWH: 0  
 LB: 0.30 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00



Rha3OBzBis\_CDC13 13C



Current Data Parameters  
 NAME Rha3OBzBis\_01\_CDCL3  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 28061023  
 Time 11.31  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 2048  
 DS 2  
 SWH 18115.841 Hz  
 FIDRES 0.276427 Hz  
 AQ 1.8088438 sec  
 RG 1024  
 DW 27.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 0.60000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127584 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

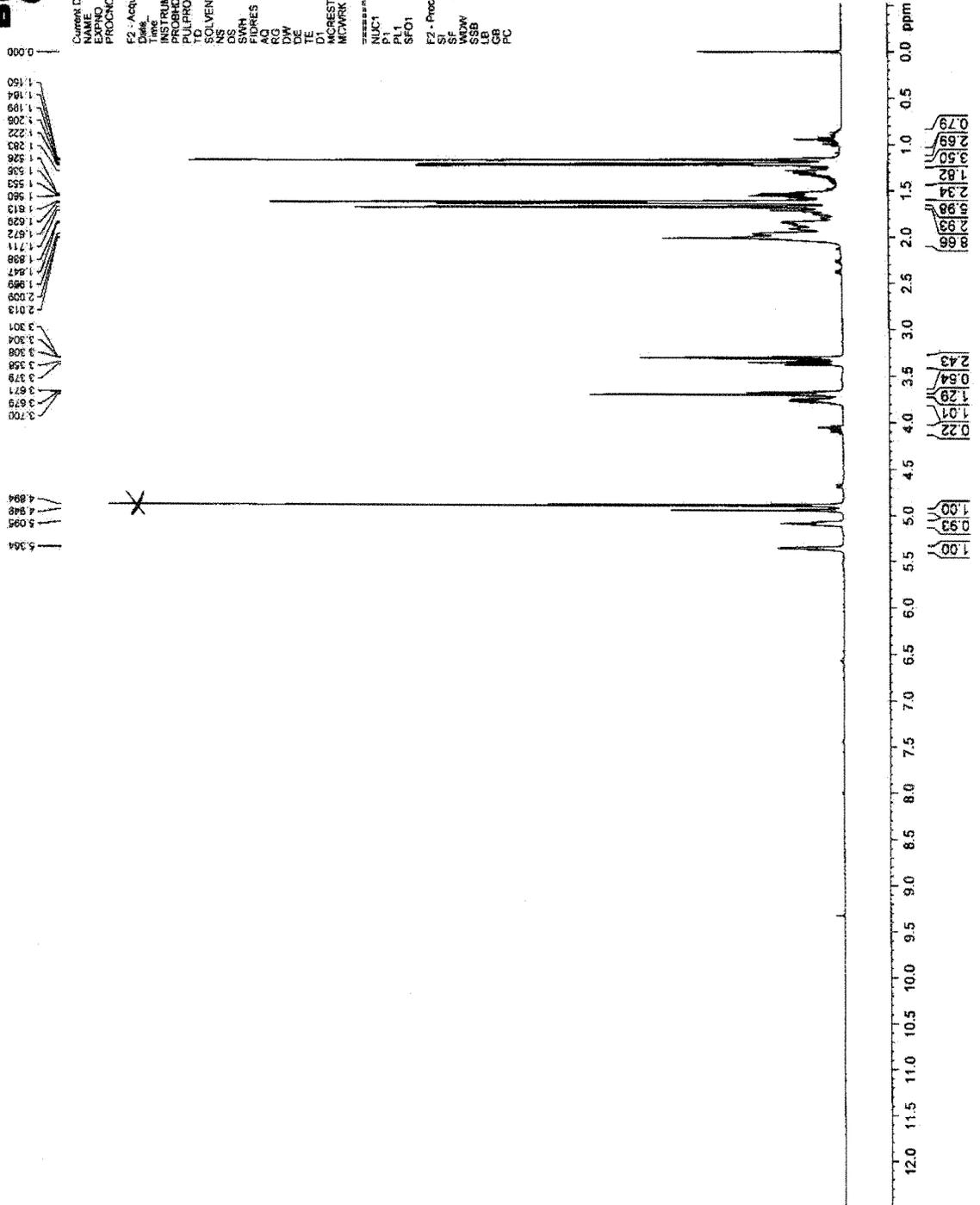


Current Data Parameters  
NAME Rhubarb\_01\_MeOD  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20061026  
Time 14.16  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT MeOD  
NS 16  
DS 4  
SWH 5270.333 Hz  
FIDRES 0.158946 Hz  
AQ 3.145773 sec  
RG 101.6  
DW 95.000 usec  
DE 1.00 usec  
TE 300.2 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.6000000 sec  
MCWPRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324088 MHz  
F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1300934 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

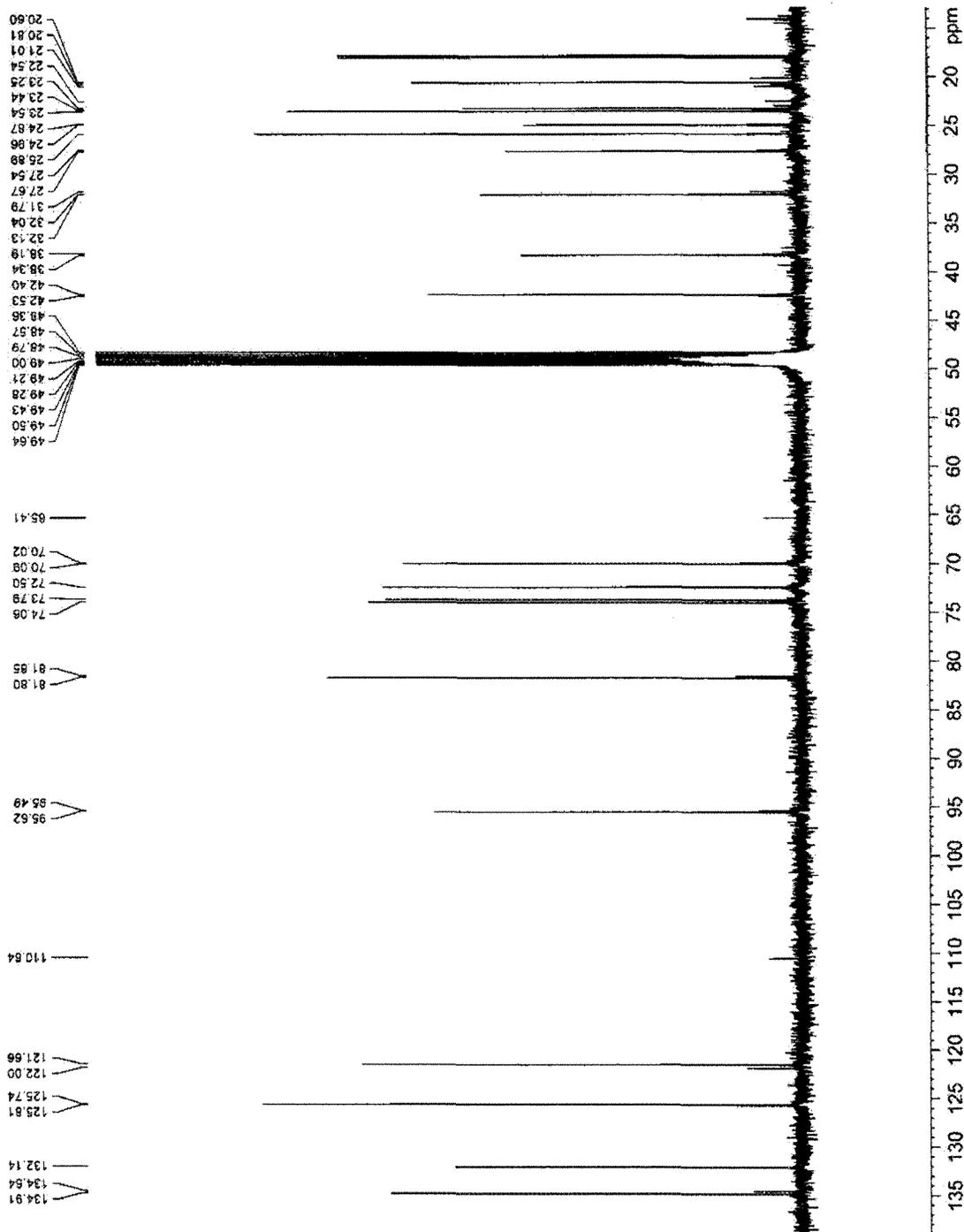
1H





Current Data Parameters  
 NAME: Rhebis\_01\_MeOD  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20061026  
 Time: 15 49  
 INSTRUM: aw400  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 65536  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 2048  
 DS: 2048  
 SWH: 20038.200 MHz  
 FIDRES: 0.306401 Hz  
 AQ: 1.6316954 sec  
 RG: 2048  
 DW: 24.300 usec  
 DE: 19.0 usec  
 TE: 300.2 K  
 D1: 0.89999999 sec  
 d11: 0.03000000 sec  
 MCREST: 0.00000000 sec  
 MCWRK: 0.01500000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1: 13C  
 P1: 10.00 usec  
 PL1: 0.00 dB  
 SFO1: 100.626189 MHz  
 ===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2: waltz16  
 NUC2: 1H  
 P2: 180.00 usec  
 PL2: -2.00 dB  
 PL12: 15.23 dB  
 PL13: 120.00 dB  
 SFO2: 400.1316008 MHz  
 F2 - Processing Parameters  
 SF: 100.6125289 MHz  
 SF2: 327.858 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 1.0 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.40

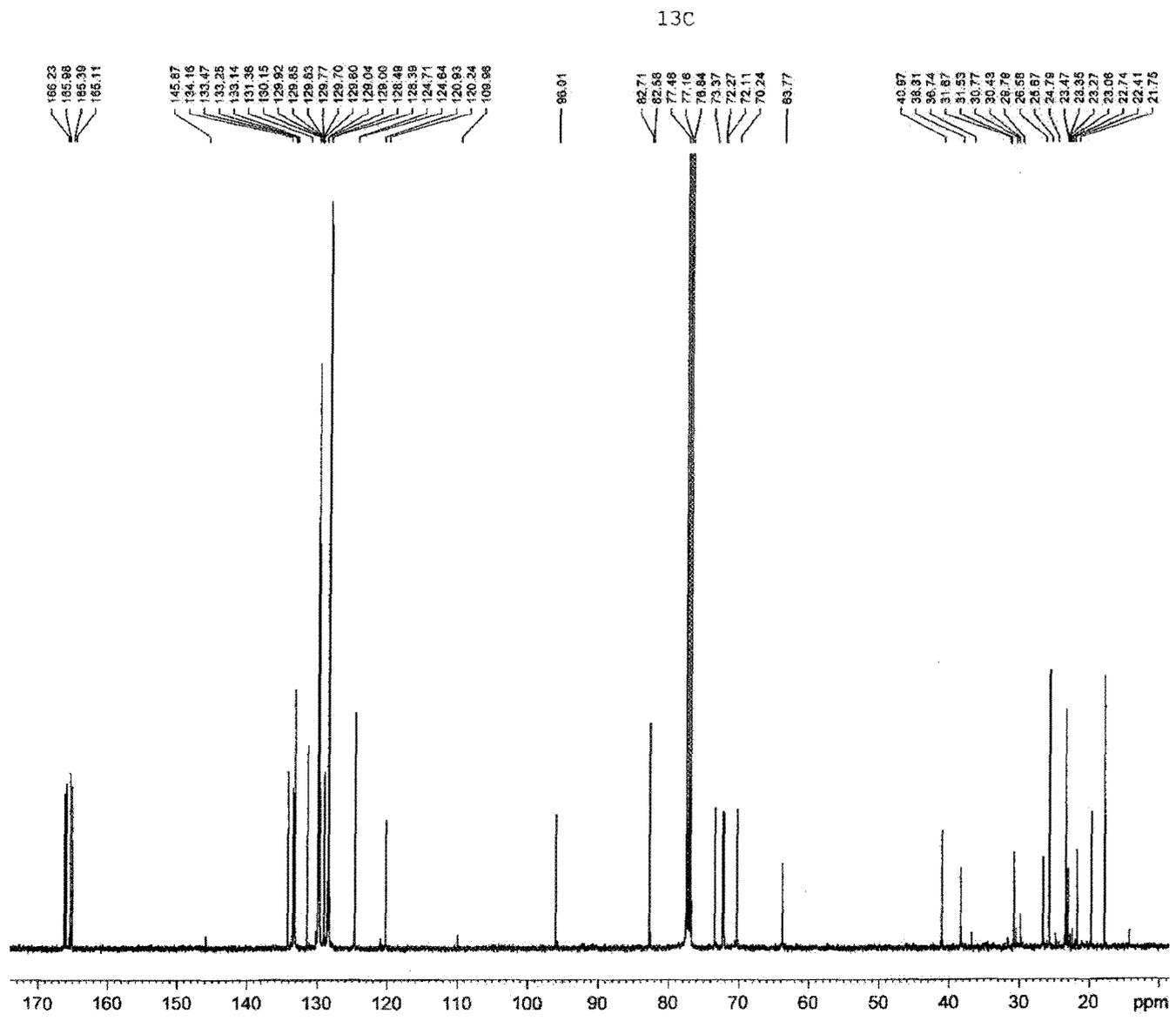
13C



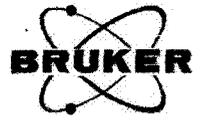
Glu4OBzBis\_CDCI3 1H



8.017  
7.999  
7.983  
7.965  
7.948  
7.933  
7.914  
7.894  
7.872  
7.850  
7.824  
7.801  
7.774  
7.751  
7.727  
7.703  
7.679  
7.655  
7.631  
7.607  
7.583  
7.559  
7.535  
7.511  
7.487  
7.463  
7.439  
7.415  
7.391  
7.367  
7.343  
7.319  
7.295  
7.271  
7.247  
7.223  
7.199  
7.175  
7.151  
7.127  
7.103  
7.079  
7.055  
7.031  
7.007  
6.983  
6.959  
6.935  
6.911  
6.887  
6.863  
6.839  
6.815  
6.791  
6.767  
6.743  
6.719  
6.695  
6.671  
6.647  
6.623  
6.599  
6.575  
6.551  
6.527  
6.503  
6.479  
6.455  
6.431  
6.407  
6.383  
6.359  
6.335  
6.311  
6.287  
6.263  
6.239  
6.215  
6.191  
6.167  
6.143  
6.119  
6.095  
6.071  
6.047  
6.023  
6.000  
5.976  
5.952  
5.928  
5.904  
5.880  
5.856  
5.832  
5.808  
5.784  
5.760  
5.736  
5.712  
5.688  
5.664  
5.640  
5.616  
5.592  
5.568  
5.544  
5.520  
5.496  
5.472  
5.448  
5.424  
5.400  
5.376  
5.352  
5.328  
5.304  
5.280  
5.256  
5.232  
5.208  
5.184  
5.160  
5.136  
5.112  
5.088  
5.064  
5.040  
5.016  
4.992  
4.968  
4.944  
4.920  
4.896  
4.872  
4.848  
4.824  
4.800  
4.776  
4.752  
4.728  
4.704  
4.680  
4.656  
4.632  
4.608  
4.584  
4.560  
4.536  
4.512  
4.488  
4.464  
4.440  
4.416  
4.392  
4.368  
4.344  
4.320  
4.296  
4.272  
4.248  
4.224  
4.200  
4.176  
4.152  
4.128  
4.104  
4.080  
4.056  
4.032  
4.008  
3.984  
3.960  
3.936  
3.912  
3.888  
3.864  
3.840  
3.816  
3.792  
3.768  
3.744  
3.720  
3.696  
3.672  
3.648  
3.624  
3.600  
3.576  
3.552  
3.528  
3.504  
3.480  
3.456  
3.432  
3.408  
3.384  
3.360  
3.336  
3.312  
3.288  
3.264  
3.240  
3.216  
3.192  
3.168  
3.144  
3.120  
3.096  
3.072  
3.048  
3.024  
3.000  
2.976  
2.952  
2.928  
2.904  
2.880  
2.856  
2.832  
2.808  
2.784  
2.760  
2.736  
2.712  
2.688  
2.664  
2.640  
2.616  
2.592  
2.568  
2.544  
2.520  
2.496  
2.472  
2.448  
2.424  
2.400  
2.376  
2.352  
2.328  
2.304  
2.280  
2.256  
2.232  
2.208  
2.184  
2.160  
2.136  
2.112  
2.088  
2.064  
2.040  
2.016  
2.000  
1.984  
1.960  
1.936  
1.912  
1.888  
1.864  
1.840  
1.816  
1.792  
1.768  
1.744  
1.720  
1.696  
1.672  
1.648  
1.624  
1.600  
1.576  
1.552  
1.528  
1.504  
1.480  
1.456  
1.432  
1.408  
1.384  
1.360  
1.336  
1.312  
1.288  
1.264  
1.240  
1.216  
1.192  
1.168  
1.144  
1.120  
1.096  
1.072  
1.048  
1.024  
1.000  
0.976  
0.952  
0.928  
0.904  
0.880  
0.856  
0.832  
0.808  
0.784  
0.760  
0.736  
0.712  
0.688  
0.664  
0.640  
0.616  
0.592  
0.568  
0.544  
0.520  
0.496  
0.472  
0.448  
0.424  
0.400  
0.376  
0.352  
0.328  
0.304  
0.280  
0.256  
0.232  
0.208  
0.184  
0.160  
0.136  
0.112  
0.088  
0.064  
0.040  
0.016  
0.000  
-0.016  
-0.040  
-0.064  
-0.088  
-0.112  
-0.136  
-0.160  
-0.184  
-0.208  
-0.232  
-0.256  
-0.280  
-0.304  
-0.328  
-0.352  
-0.376  
-0.400  
-0.424  
-0.448  
-0.472  
-0.496  
-0.520  
-0.544  
-0.568  
-0.592  
-0.616  
-0.640  
-0.664  
-0.688  
-0.712  
-0.736  
-0.760  
-0.784  
-0.808  
-0.832  
-0.856  
-0.880  
-0.904  
-0.928  
-0.952  
-0.976  
-1.000  
-1.024  
-1.048  
-1.072  
-1.096  
-1.120  
-1.144  
-1.168  
-1.192  
-1.216  
-1.240  
-1.264  
-1.288  
-1.312  
-1.336  
-1.360  
-1.384  
-1.408  
-1.432  
-1.456  
-1.480  
-1.504  
-1.528  
-1.552  
-1.576  
-1.600  
-1.624  
-1.648  
-1.672  
-1.696  
-1.720  
-1.744  
-1.768  
-1.792  
-1.816  
-1.840  
-1.864  
-1.888  
-1.912  
-1.936  
-1.960  
-1.984  
-2.008  
-2.032  
-2.056  
-2.080  
-2.104  
-2.128  
-2.152  
-2.176  
-2.200  
-2.224  
-2.248  
-2.272  
-2.296  
-2.320  
-2.344  
-2.368  
-2.392  
-2.416  
-2.440  
-2.464  
-2.488  
-2.512  
-2.536  
-2.560  
-2.584  
-2.608  
-2.632  
-2.656  
-2.680  
-2.704  
-2.728  
-2.752  
-2.776  
-2.800  
-2.824  
-2.848  
-2.872  
-2.896  
-2.920  
-2.944  
-2.968  
-2.992  
-3.016  
-3.040  
-3.064  
-3.088  
-3.112  
-3.136  
-3.160  
-3.184  
-3.208  
-3.232  
-3.256  
-3.280  
-3.304  
-3.328  
-3.352  
-3.376  
-3.400  
-3.424  
-3.448  
-3.472  
-3.496  
-3.520  
-3.544  
-3.568  
-3.592  
-3.616  
-3.640  
-3.664  
-3.688  
-3.712  
-3.736  
-3.760  
-3.784  
-3.808  
-3.832  
-3.856  
-3.880  
-3.904  
-3.928  
-3.952  
-3.976  
-4.000  
-4.024  
-4.048  
-4.072  
-4.096  
-4.120  
-4.144  
-4.168  
-4.192  
-4.216  
-4.240  
-4.264  
-4.288  
-4.312  
-4.336  
-4.360  
-4.384  
-4.408  
-4.432  
-4.456  
-4.480  
-4.504  
-4.528  
-4.552  
-4.576  
-4.600  
-4.624  
-4.648  
-4.672  
-4.696  
-4.720  
-4.744  
-4.768  
-4.792  
-4.816  
-4.840  
-4.864  
-4.888  
-4.912  
-4.936  
-4.960  
-4.984  
-5.008  
-5.032  
-5.056  
-5.080  
-5.104  
-5.128  
-5.152  
-5.176  
-5.200  
-5.224  
-5.248  
-5.272  
-5.296  
-5.320  
-5.344  
-5.368  
-5.392  
-5.416  
-5.440  
-5.464  
-5.488  
-5.512  
-5.536  
-5.560  
-5.584  
-5.608  
-5.632  
-5.656  
-5.680  
-5.704  
-5.728  
-5.752  
-5.776  
-5.800  
-5.824  
-5.848  
-5.872  
-5.896  
-5.920  
-5.944  
-5.968  
-5.992  
-6.016  
-6.040  
-6.064  
-6.088  
-6.112  
-6.136  
-6.160  
-6.184  
-6.208  
-6.232  
-6.256  
-6.280  
-6.304  
-6.328  
-6.352  
-6.376  
-6.400  
-6.424  
-6.448  
-6.472  
-6.496  
-6.520  
-6.544  
-6.568  
-6.592  
-6.616  
-6.640  
-6.664  
-6.688  
-6.712  
-6.736  
-6.760  
-6.784  
-6.808  
-6.832  
-6.856  
-6.880  
-6.904  
-6.928  
-6.952  
-6.976  
-7.000  
-7.024  
-7.048  
-7.072  
-7.096  
-7.120  
-7.144  
-7.168  
-7.192  
-7.216  
-7.240  
-7.264  
-7.288  
-7.312  
-7.336  
-7.360  
-7.384  
-7.408  
-7.432  
-7.456  
-7.480  
-7.504  
-7.528  
-7.552  
-7.576  
-7.600  
-7.624  
-7.648  
-7.672  
-7.696  
-7.720  
-7.744  
-7.768  
-7.792  
-7.816  
-7.840  
-7.864  
-7.888  
-7.912  
-7.936  
-7.960  
-7.984  
-8.008  
-8.032  
-8.056  
-8.080  
-8.104  
-8.128  
-8.152  
-8.176  
-8.200  
-8.224  
-8.248  
-8.272  
-8.296  
-8.320  
-8.344  
-8.368  
-8.392  
-8.416  
-8.440  
-8.464  
-8.488  
-8.512  
-8.536  
-8.560  
-8.584  
-8.608  
-8.632  
-8.656  
-8.680  
-8.704  
-8.728  
-8.752  
-8.776  
-8.800  
-8.824  
-8.848  
-8.872  
-8.896  
-8.920  
-8.944  
-8.968  
-8.992  
-9.016  
-9.040  
-9.064  
-9.088  
-9.112  
-9.136  
-9.160  
-9.184  
-9.208  
-9.232  
-9.256  
-9.280  
-9.304  
-9.328  
-9.352  
-9.376  
-9.400  
-9.424  
-9.448  
-9.472  
-9.496  
-9.520  
-9.544  
-9.568  
-9.592  
-9.616  
-9.640  
-9.664  
-9.688  
-9.712  
-9.736  
-9.760  
-9.784  
-9.808  
-9.832  
-9.856  
-9.880  
-9.904  
-9.928  
-9.952  
-9.976  
-10.000  
-10.024  
-10.048  
-10.072  
-10.096  
-10.120  
-10.144  
-10.168  
-10.192  
-10.216  
-10.240  
-10.264  
-10.288  
-10.312  
-10.336  
-10.360  
-10.384  
-10.408  
-10.432  
-10.456  
-10.480  
-10.504  
-10.528  
-10.552  
-10.576  
-10.600  
-10.624  
-10.648  
-10.672  
-10.696  
-10.720  
-10.744  
-10.768  
-10.792  
-10.816  
-10.840  
-10.864  
-10.888  
-10.912  
-10.936  
-10.960  
-10.984  
-11.008  
-11.032  
-11.056  
-11.080  
-11.104  
-11.128  
-11.152  
-11.176  
-11.200  
-11.224  
-11.248  
-11.272  
-11.296  
-11.320  
-11.344  
-11.368  
-11.392  
-11.416  
-11.440  
-11.464  
-11.488  
-11.512  
-11.536  
-11.560  
-11.584  
-11.608  
-11.632  
-11.656  
-11.680  
-11.704  
-11.728  
-11.752  
-11.776  
-11.800  
-11.824  
-11.848  
-11.872  
-11.896  
-11.920  
-11.944  
-11.968  
-11.992  
-12.016  
-12.040  
-12.064  
-12.088  
-12.112  
-12.136  
-12.160  
-12.184  
-12.208  
-12.232  
-12.256  
-12.280  
-12.304  
-12.328  
-12.352  
-12.376  
-12.400  
-12.424  
-12.448  
-12.472  
-12.496  
-12.520  
-12.544  
-12.568  
-12.592  
-12.616  
-12.640  
-12.664  
-12.688  
-12.712  
-12.736  
-12.760  
-12.784  
-12.808  
-12.832  
-12.856  
-12.880  
-12.904  
-12.928  
-12.952  
-12.976  
-13.000  
-13.024  
-13.048  
-13.072  
-13.096  
-13.120  
-13.144  
-13.168  
-13.192  
-13.216  
-13.240  
-13.264  
-13.288  
-13.312  
-13.336  
-13.360  
-13.384  
-13.408  
-13.432  
-13.456  
-13.480  
-13.504  
-13.528  
-13.552  
-13.576  
-13.600  
-13.624  
-13.648  
-13.672  
-13.696  
-13.720  
-13.744  
-13.768  
-13.792  
-13.816  
-13.840  
-13.864  
-13.888  
-13.912  
-13.936  
-13.960  
-13.984  
-14.008  
-14.032  
-14.056  
-14.080  
-14.104  
-14.128  
-14.152  
-14.176  
-14.200  
-14.224  
-14.248  
-14.272  
-14.296  
-14.320  
-14.344  
-14.368  
-14.392  
-14.416  
-14.440  
-14.464  
-14.488  
-14.512  
-14.536  
-14.560  
-14.584  
-14.608  
-14.632  
-14.656  
-14.680  
-14.704  
-14.728  
-14.752  
-14.776  
-14.800  
-14.824  
-14.848  
-14.872  
-14.896  
-14.920  
-14.944  
-14.968  
-14.992  
-15.016  
-15.040  
-15.064  
-15.088  
-15.112  
-15.136  
-15.160  
-15.184  
-15.208  
-15.232  
-15.256  
-15.280  
-15.304  
-15.328  
-15.352  
-15.376  
-15.400  
-15.424  
-15.448  
-15.472  
-15.496  
-15.520  
-15.544  
-15.568  
-15.592  
-15.616  
-15.640  
-15.664  
-15.688  
-15.712  
-15.736  
-15.760  
-15.784  
-15.808  
-15.832  
-15.856  
-15.880  
-15.904  
-15.928  
-15.952  
-15.976  
-16.000  
-16.024  
-16.048  
-16.072  
-16.096  
-16.120  
-16.144  
-16.168  
-16.192  
-16.216  
-16.240  
-16.264  
-16.288  
-16.312  
-16.336  
-16.360  
-16.384  
-16.408  
-16.432  
-16.456  
-16.480  
-16.504  
-16.528  
-16.552  
-16.576  
-16.600  
-16.624  
-16.648  
-16.672  
-16.696  
-16.720  
-16.744  
-16.768  
-16.792  
-16.816  
-16.840  
-16.864  
-16.888  
-16.912  
-16.936  
-16.960  
-16.984  
-17.008  
-17.032  
-17.056  
-17.080  
-17.104  
-17.128  
-17.152  
-17.176  
-17.200  
-17.224  
-17.248  
-17.272  
-17.296  
-17.320  
-17.344  
-17.368  
-17.392  
-17.416  
-17.440  
-17.464  
-17.488  
-17.512  
-17.536  
-17.560  
-17.584  
-17.608  
-17.632  
-17.656  
-17.680  
-17.704  
-17.728  
-17.752  
-17.776  
-17.800  
-17.824  
-17.848  
-17.872  
-17.896  
-17.920  
-17.944  
-17.968  
-17.992  
-18.016  
-18.040  
-18.064  
-18.088  
-18.112  
-18.136  
-18.160  
-18.184  
-18.208  
-18.232  
-18.256  
-18.280  
-18.304  
-18.328  
-18.352  
-18.376  
-18.400  
-18.424  
-18.448  
-18.472  
-18.496  
-18.520  
-18.544  
-18.568  
-18.592  
-18.616  
-18.640  
-18.664  
-18.688  
-18.712  
-18.736  
-18.760  
-18.784  
-18.808  
-18.832  
-18.856  
-18.880  
-18.904  
-18.928  
-18.952  
-18.976  
-19.000  
-19.024  
-19.048  
-19.072  
-19.096  
-19.120  
-19.144  
-19.168  
-19.192  
-19.216  
-19.240  
-19.264  
-19.288  
-19.312  
-19.336  
-19.360  
-19.384  
-19.408  
-19.432  
-19.456  
-19.480  
-19.504  
-19.528  
-19.552  
-19.576  
-19.600  
-19.624  
-19.648  
-19.672  
-19.696  
-19.720  
-19.744  
-19.768  
-19.792  
-19.816  
-19.840  
-19.864  
-19.888  
-19.912  
-19.936  
-19.960  
-19.984  
-20.008  
-20.032  
-20.056  
-20.080  
-20.104  
-20.128  
-20.152  
-20.176  
-20.200  
-20.224  
-20.248  
-20.272  
-20.296  
-20.320  
-20.344  
-20.368  
-20.392  
-20.416  
-20.440  
-20.464  
-20.488  
-20.512  
-20.536  
-20.560  
-20.584  
-20.608  
-20.632  
-20.656  
-20.680  
-20.704  
-20.728  
-20.752  
-20.776  
-20.800  
-20.824  
-20.848  
-20.872  
-20.896  
-20.920  
-20.944  
-20.968  
-20.992  
-21.016  
-21.040  
-21.064  
-21.088  
-21.112  
-21.136  
-21.160  
-21.184  
-21.208  
-21.232  
-21.256  
-21.280  
-21.304  
-21.328  
-21.352  
-21.376  
-21.400  
-21.424  
-21.448  
-21.472  
-21.496  
-21.520  
-21.544  
-21.568  
-21.592  
-21.616  
-21.640  
-21.664  
-21.688  
-21.712  
-21.736  
-21.760  
-21.784  
-21.808  
-21.832  
-21.856  
-21.880  
-21.904  
-21.928  
-21.952  
-21.976  
-22.000  
-22.024  
-22.048  
-22.072  
-22.096  
-22.120  
-22.144  
-22.168  
-22.192  
-22.216  
-22.240  
-22.264  
-22.288  
-22.312  
-22.336  
-22.360  
-22.384  
-22.408  
-22.432  
-22.456  
-22.480  
-22.504  
-22.528  
-22.552  
-22.576  
-22.600  
-22.624  
-22.648  
-22.672  
-22.696  
-22.720  
-22.744  
-22.768  
-22.792  
-22.816  
-22.840  
-22.864  
-22.888  
-22.912  
-22.936  
-22.960  
-22.984  
-23.008  
-23.032  
-23.056  
-23.080  
-23.104  
-23.128  
-23.152  
-23.176  
-23.200  
-23.224  
-23.248  
-23.272  
-23.296  
-23.320  
-23.344  
-23.368  
-23.392  
-23.416  
-23.440  
-23.464  
-23.488  
-23.512  
-23.536  
-23.560  
-23.584  
-23.608  
-23.632  
-23.656  
-23.680  
-23.704  
-23.728  
-23.752  
-23.776  
-23.800  
-23.824  
-23.848  
-23.872  
-23.896  
-23.920  
-23.944  
-23.968  
-23.992  
-24.016  
-24.040  
-24.064  
-24.088  
-24.112  
-24.136  
-24.160  
-24.184  
-24.208  
-24.232  
-24.256  
-24.280  
-24.304  
-24.328  
-24.352  
-24.376  
-24.400  
-24.424  
-24.448  
-24.472  
-24.496  
-24.520  
-24.544  
-24.568  
-24.592  
-24.616  
-24.640  
-24.664  
-24.688  
-24.712  
-24.736  
-24.760  
-24.784  
-24.808  
-24.832  
-24.856  
-24.880  
-24.904  
-24.928  
-24.952  
-24.976  
-25.000  
-25.024  
-25.048  
-25.072  
-25.096  
-25.120  
-25.144  
-25.168  
-25.192  
-25.216  
-25.240  
-25.264  
-25.288  
-25.312  
-25.336  
-25.360  
-25.384  
-25.408  
-25.432  
-25.456  
-25.480  
-25.504  
-25.528  
-25.552  
-25.576  
-25.600  
-25.624  
-25.648  
-25.672  
-25.696  
-25.720  
-25.744  
-25.768  
-25.792  
-25.816  
-25.840  
-25.864  
-25.888  
-25.912  
-25.936  
-25.960  
-25.984  
-26.008  
-26.032  
-26.056  
-26.080  
-26.104  
-26.128  
-26.152  
-26.176  
-26.200  
-26.224  
-26.248  
-26.272  
-26.296  
-26.320  
-26.344  
-26.368  
-26.392  
-26.416  
-26.440  
-26.464  
-26.488  
-26.512  
-26.536  
-26.560  
-26.584  
-26.608  
-26.632  
-26.656  
-26.680  
-26.704  
-26.728  
-26.752  
-26.776  
-26.800  
-26.824  
-26.848  
-26.872  
-26.896  
-26.920  
-26.944  
-26.968  
-26.992  
-27.016  
-27.040  
-27.064  
-27.088  
-27.112  
-27.136  
-27.160  
-27.184  
-27.208  
-27.232  
-27.256  
-27.280  
-27.304  
-27.328  
-27.352  
-27.376  
-27.400  
-27.424  
-27.448  
-27.472  
-27.



13C



Current Data Parameters  
 NAME: Glu4bz\_CDCl3  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061116  
 Time 15.22  
 INSTRUM av400  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 2048  
 DS 2  
 SWH 18115.941 Hz  
 FIDRES 0.278427 Hz  
 AQ 1.6088436 sec  
 RG 912.3  
 DW 27.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 0.6969996 sec  
 d11 0.0300000 sec  
 MCREST 0.0000000 sec  
 MCWRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 190.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127633 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40



Current Data Parameters  
NAME Galact01  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 Acquisition Parameters  
Date\_ 20080815  
Time 13:53  
INSTRUM aw400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 65536  
SOLVENT MeOD  
NS 16  
DS 0

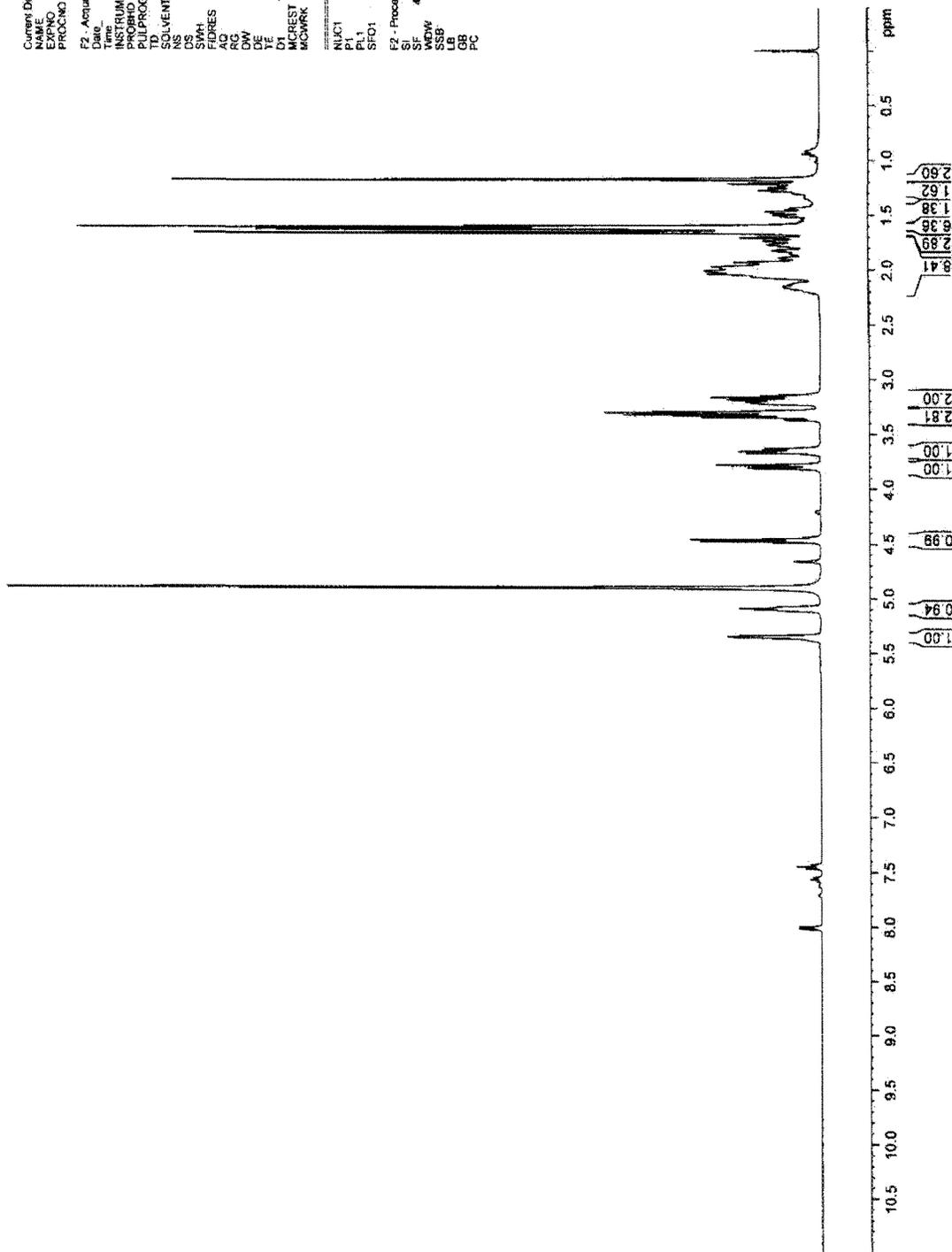
SWH 5208.933 Hz  
FIDRES 0.349 Hz  
AQ 3.1437779 sec  
RG 64  
DW 96.000 usec  
DE 6.00 usec  
TE 300.2 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.0000000 sec  
MCMWRS 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

F2 Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1330088 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
GB 0  
PC 1.00

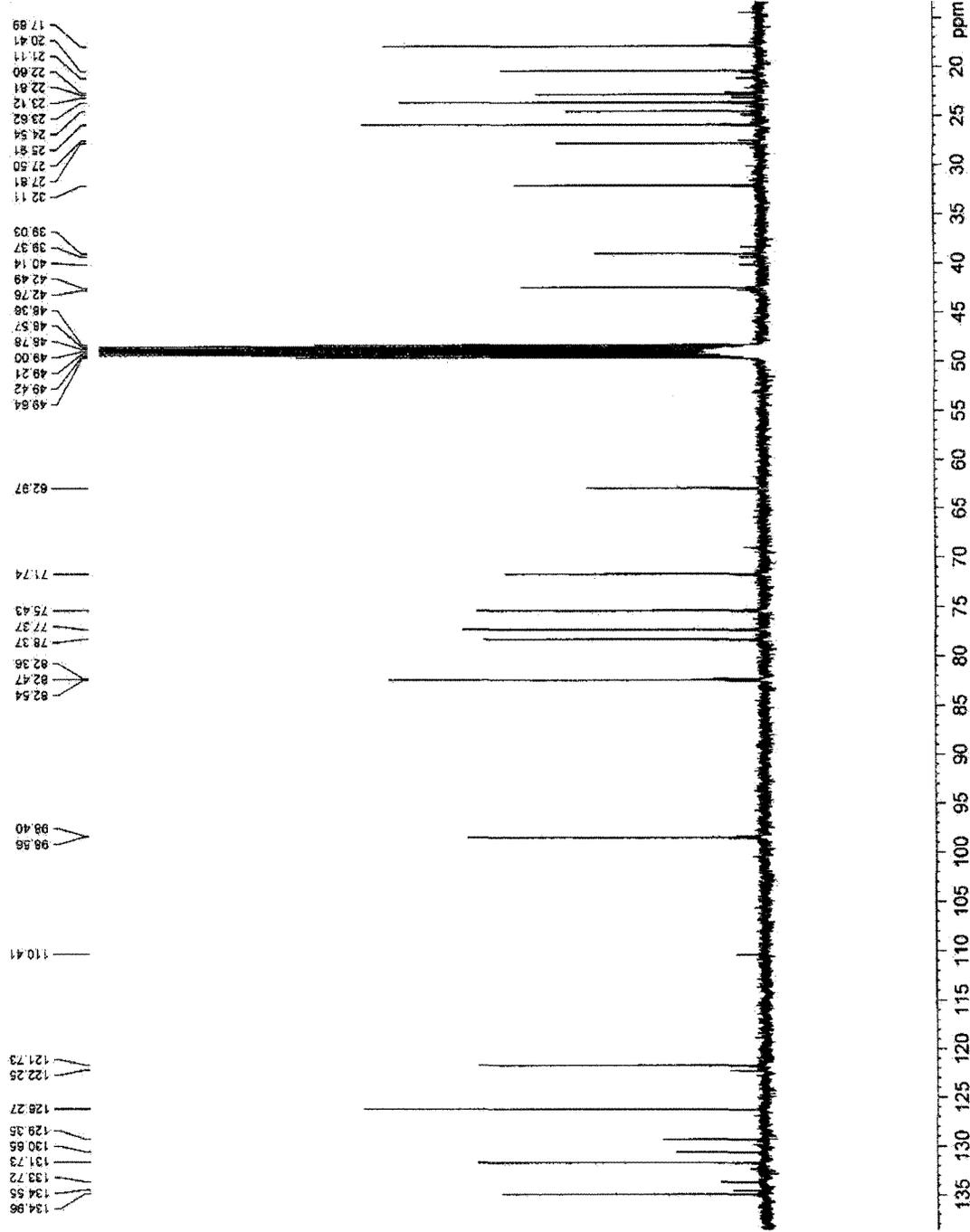
1H



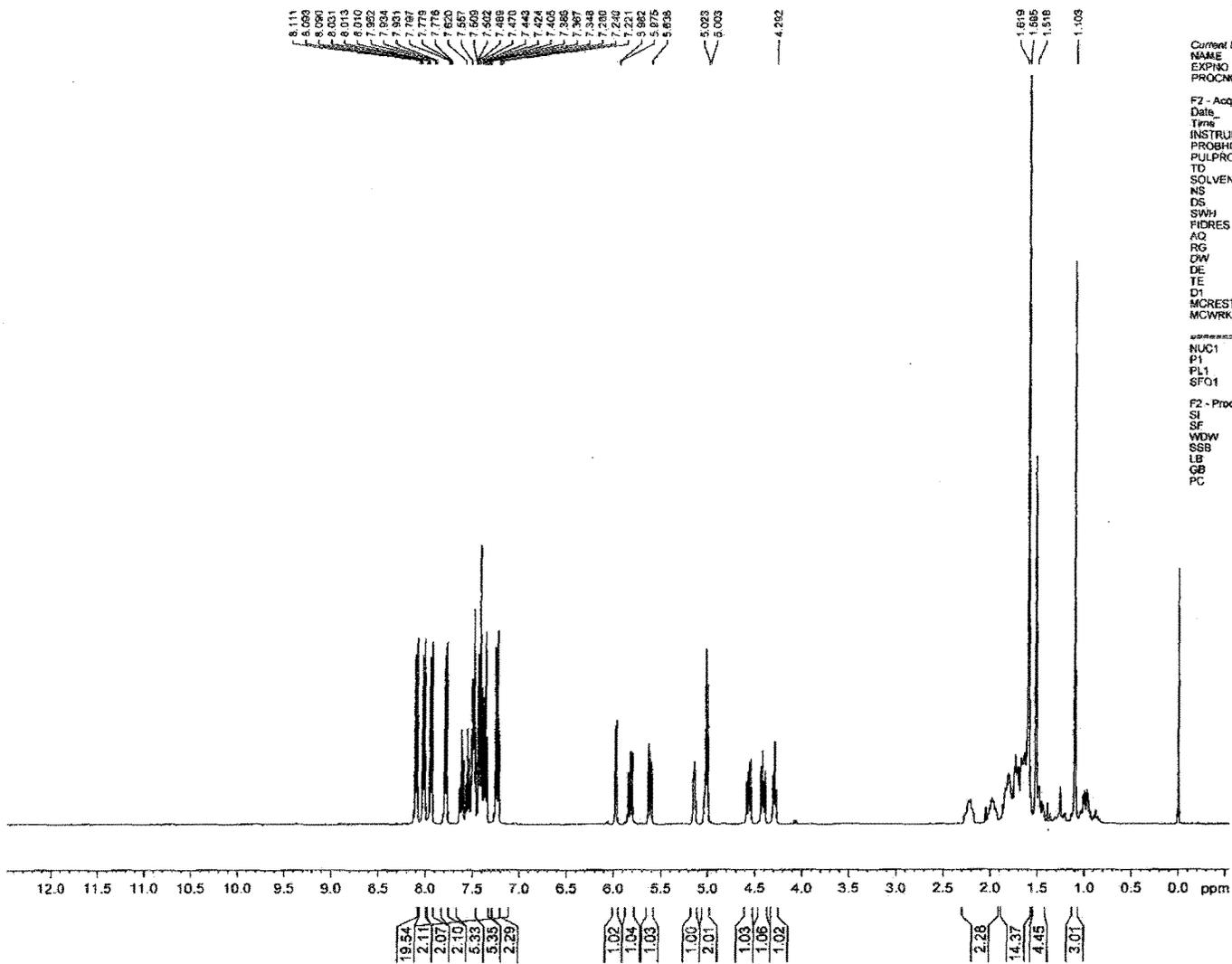


Current Date Parameters  
 NAME Chubas01  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20060815  
 Time 14.44  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT MeOD  
 DS 2  
 SFO1 100.626384 MHz  
 SWH 24154.500 Hz  
 FIDRES 0.386570 Hz  
 AQ 1.3566452 sec  
 RG 2070 usec  
 DE 2.00 usec  
 TE 300.2 K  
 D1 0.69999999 sec  
 d11 REST 0.03000000 sec  
 DELT 0.00000000 sec  
 MCWK 0.01600000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.626384 MHz  
 ===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 hzgpg30  
 NUC2 1H  
 P2 60.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 P12 120.00 usec  
 PL12 19.00 dB  
 SFO2 400.1318003 MHz  
 F2 - Processing Parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6176319 MHz  
 EM 0  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

13C



Gal4OBzBis\_CDCI3 1H



8.111  
8.090  
8.081  
8.031  
8.013  
8.010  
7.952  
7.934  
7.931  
7.797  
7.778  
7.776  
7.620  
7.557  
7.509  
7.502  
7.488  
7.470  
7.443  
7.442  
7.405  
7.385  
7.367  
7.348  
7.280  
7.240  
7.221  
6.972  
5.872  
5.838  
5.023  
5.003  
4.262

1.515  
1.505  
1.516  
1.109

```
Current Data Parameters
NAME Gal4OBzBis_CDCI3
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20061108
Time 10.50
INSTRUM av400
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 0
SWH 6208.333 Hz
FIDRES 0.158946 Hz
AQ 3.1457779 sec
RG 161.3
CIV 98.000 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01600000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 11.00 usec
PL1 -2.00 dB
SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300175 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00
```



Current Data Parameters  
 EXPNO 2  
 GAD30191\_CD03  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

File\_ 20051108  
 Date\_ 12/27  
 INSTRUM 12 9M409  
 PROBRD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 ID 658  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 2048  
 DS 2  
 SWH 162.841 Hz  
 FIDRES 0.276427 Hz  
 AQ 1.8098436 sec  
 RG 724.1  
 DW 27.600 usec  
 DE 0.0 usec  
 TE 300.2 K  
 D1 0.69699699 sec  
 d11 0.00000000 sec  
 PRGNT 0.00000000 sec  
 MCNMR 0.01600000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

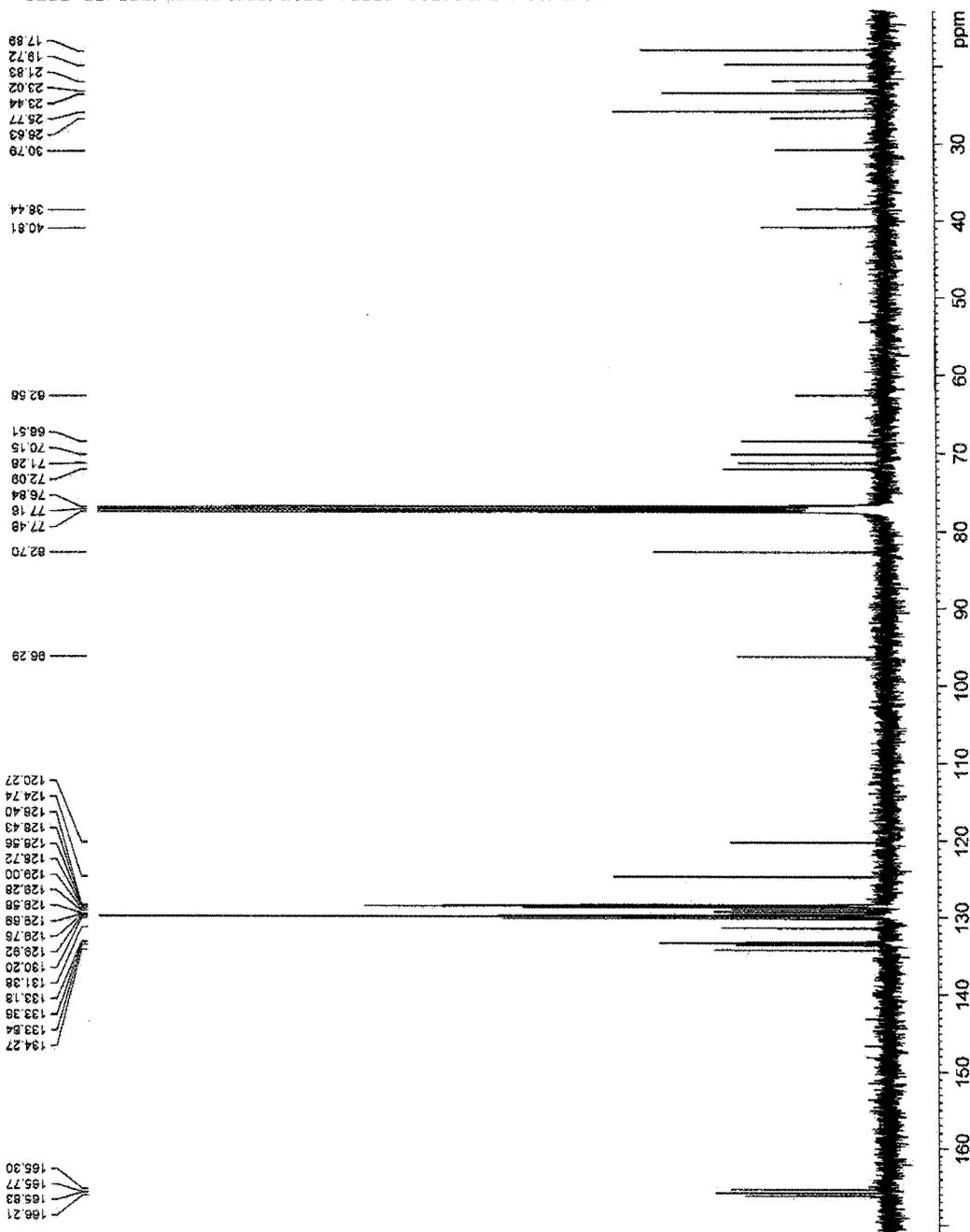
===== CHANNEL f2 =====

CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 P2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 0.00 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1315005 MHz

F2 - Processing parameters

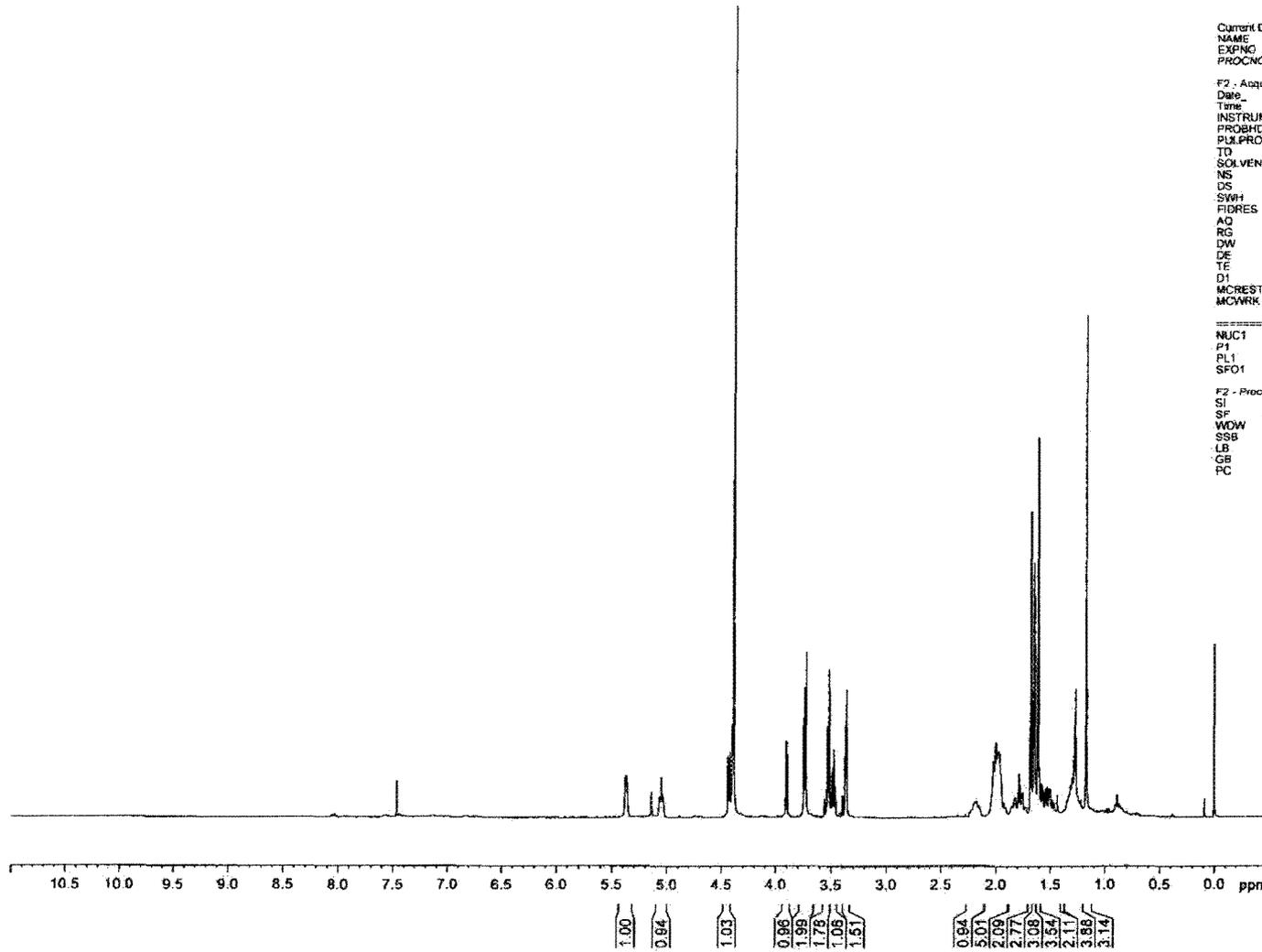
SI 32  
 SF 100.6127589 MHz  
 WDWW 0 ETM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

13C





1H



Current Data Parameters  
NAME GsdBis\_12-12-06\_MeOO\_COCC  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20061212  
Time 10.27  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT MeOD  
NS 16  
DS 0  
SWH 5208.333 Hz  
FIDRES 0.158946 Hz  
AQ 3.1457779 sec  
RG 161.3  
DW 96.000 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.0000000 sec  
MCWRK 0.01500000 sec

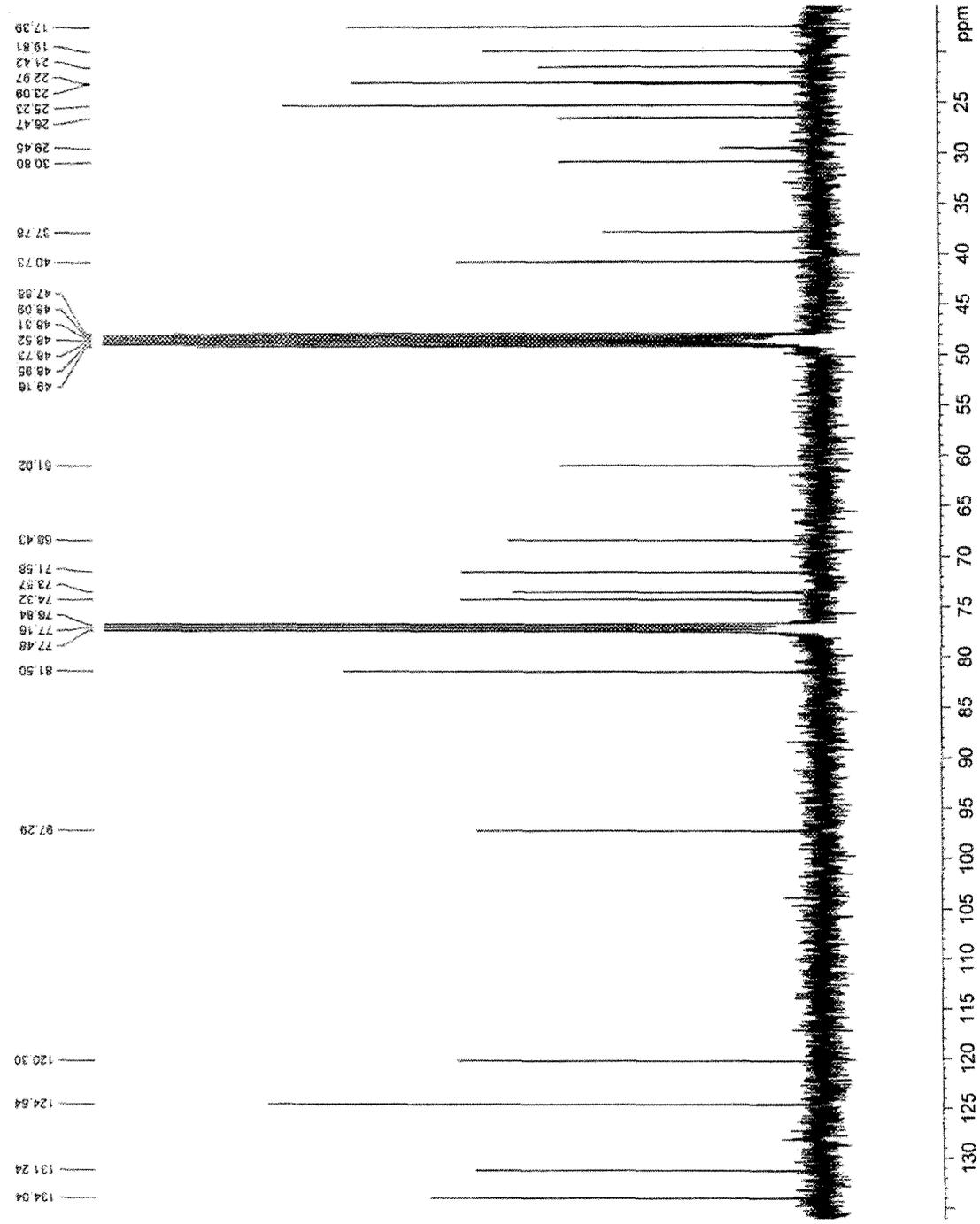
===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1299881 MHz  
WOW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00



**Current Data Parameters**  
 NAME: G88s\_12 13C\_MeCO\_1  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 2  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061212  
 Time 12:05  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 256  
 DS 4  
 SWH 16126.032 Hz  
 FIDRES 0.246110 Hz  
 AQ 2.0315660 sec  
 RG 299.73  
 DTV 6100.000  
 TE 300 K  
 DE 0.65000000 sec  
 DT1 0.00000000 sec  
 ACQRES 0.00000000 sec  
 REFIN 0.01000000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL 0.00 dB  
 SFO1 100.626180 MHz  
 ===== CHANNEL f2 =====  
 CPROGR2 waltz16  
 INSTR2 spect  
 PROB2 5 mm QNP 1H/13  
 PUL2 zgpg30  
 PL12 -2.00 dB  
 PL13 15.23 dB  
 PL14 126.00 dB  
 SFO2 400.1316006 MHz  
**F2 - Processing parameters**  
 SI 32768  
 SF 100.6127611 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 CB 1.00 Hz  
 CC 0  
 PC 1.40

13C



Man4OBzBis\_CDCI3 1H

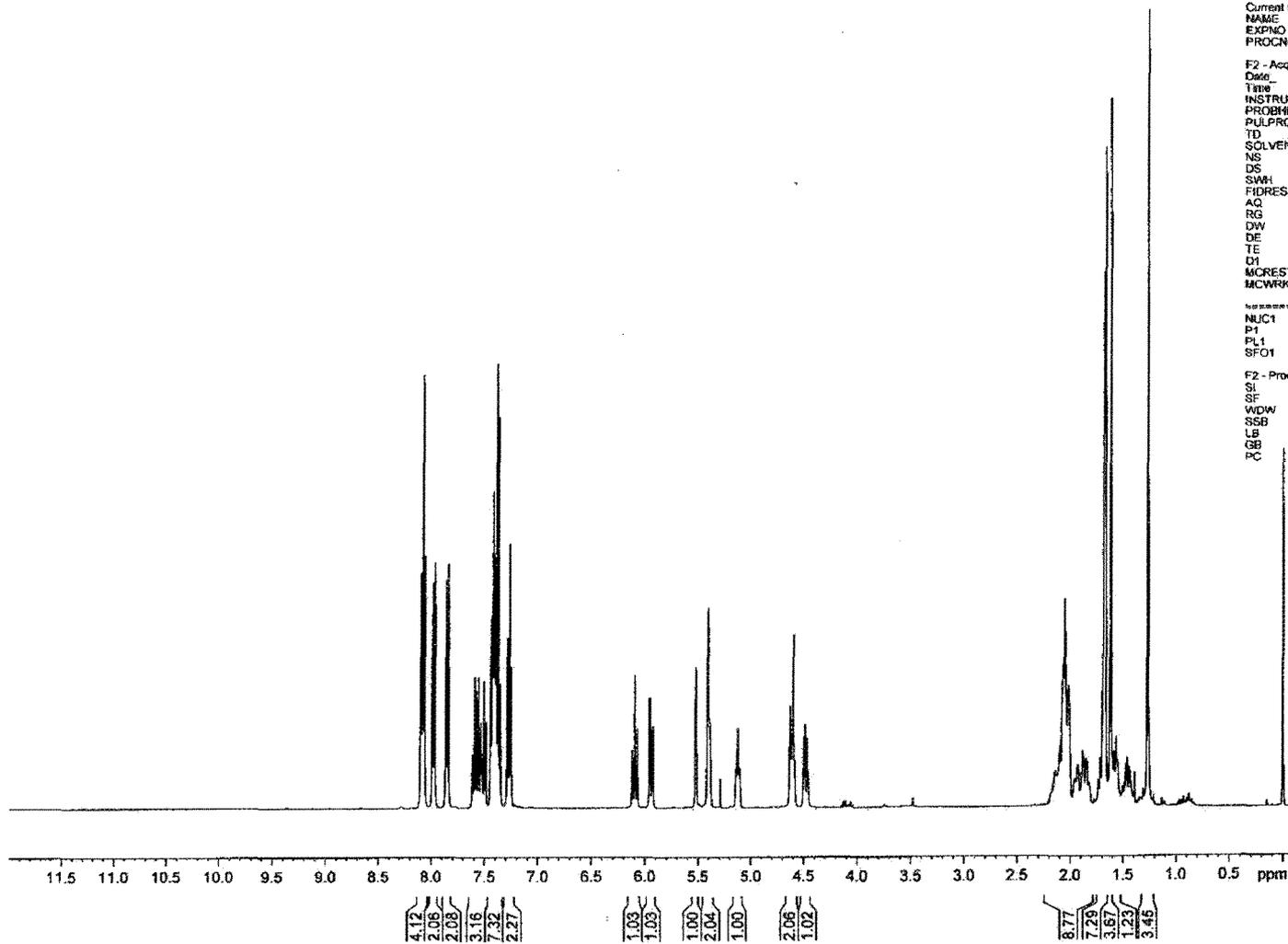


Current Data Parameters  
NAME ManBis4Bz\_CDCI3  
EXPNO 1  
PROCNO 1

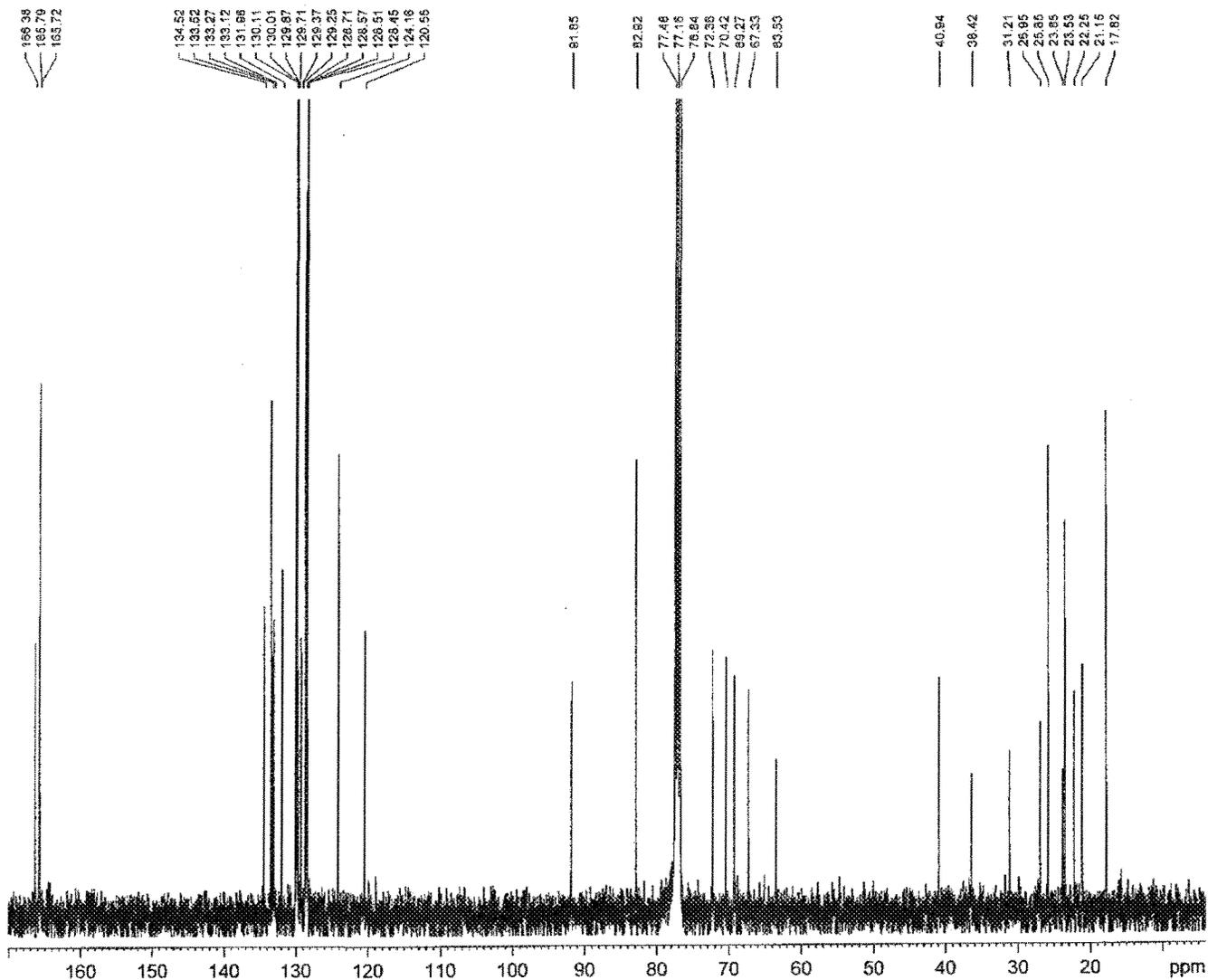
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20061115  
Time 9.31  
INSTRUM gn400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 16  
DS 0  
SWH 5208.333 Hz  
FIDRES 0.158846 Hz  
AQ 3.1457779 sec  
RG 181  
DW 96.000 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.0000000 sec  
MCWRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1300185 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00



Man4OBzBis\_CDC13 13C



Current Data Parameters  
 NAME ManBis4Bz\_CDC13  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061115  
 Time 11.07  
 INSTRUM av400  
 PROBHID 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 2048  
 DS 2  
 SWH 18115.941 Hz  
 FIDRES 0.270427 Hz  
 AQ 1.8989438 sec  
 RG 724.1  
 DW 27.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 0.0 K  
 D1 0.60000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 MCREST 0.00000000 sec  
 MCWRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 100.6218241 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 FCPD2 80.00 usec  
 PL2 -2.00 dB  
 PL12 15.23 dB  
 PL13 120.00 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters:  
 S1 32768  
 SF 100.6127567 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1H

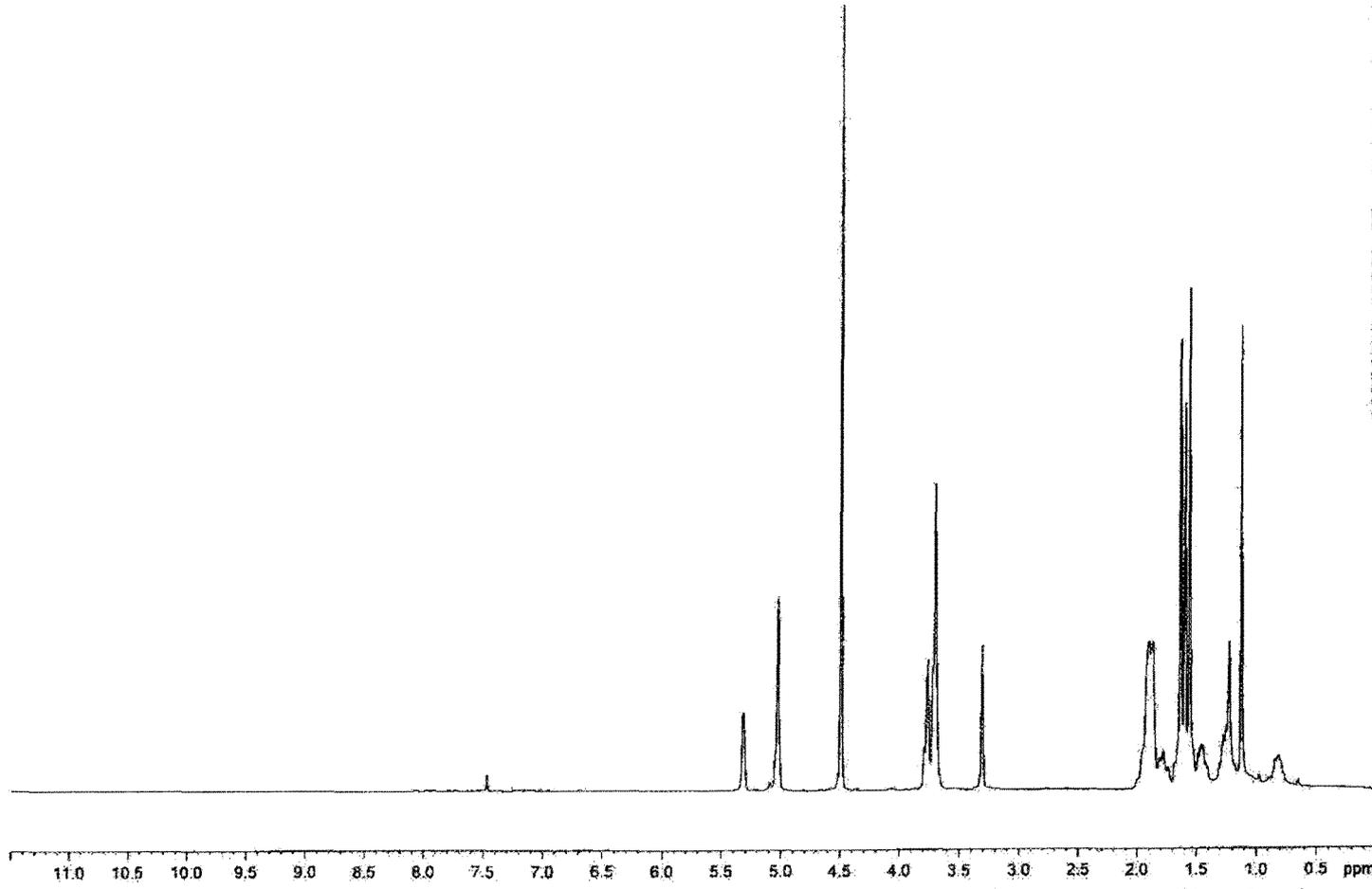


Current Data Parameters  
NAME ManBis\_16\_01\_2007  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20070116  
Time 14 35  
INSTRUM av400  
PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT MeOD  
NS 16  
DS 0  
SWH 4789 272 Hz  
FIDRES 0.146157 Hz  
AQ 3.4210291 sec  
RG 151.3  
DW 504.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 0.0 K  
D1 1.0000000 sec  
MCREST 0.0000000 sec  
MCWRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 11.00 usec  
PL1 -2.00 dB  
SFO1 400.1324008 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 400.1300187 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00





Control Data Parameters  
 NAME: Mambis\_2\_14-12-06\_CD03  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters

Date\_ 20061214

Time\_ 14.35

INSTRUM\_ spect

PROBHD\_ 5mm QNP-1H13

NUC1\_ 13C

NUC2\_ 13C

SOLVENT\_ CDCl3

NS\_ 5120

DS\_ 2

SWH\_ 161.072746

FIDRES\_ 0.24611052

AQ\_ 2.0316660 sec

RG\_ 3280.2

DW\_ 91.000 usec

DE\_ 0.1 usec

TE\_ 300.2 K

DT\_ 0.69559998 sec

d11\_ 0.03000000 sec

MCREST\_ 0.00000000 sec

MDPRK\_ 0.21000000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1\_ 13C

PC1\_ 40.00 usec

PL1\_ 0.00 dB

SFO1\_ 100.628160 MHz

===== CHANNEL f2 =====

CPDPRG2\_ waltz16

NUC2\_ 13C

PCPD2\_ 80.00 usec

PL2\_ -2.00 dB

PL12\_ 19.23 dB

PL13\_ 130.00 dB

SFO2\_ 400.1516800 MHz

PR - Processing parameters:

SI\_ 32768

SF\_ 100.627028 MHz

WDW\_ EM

SSB\_ 0

LB\_ 1.00 Hz

GB\_ 0

PC\_ 1.00

13C

