

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

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

PAR
CHARLES SIROIS
B. Sc. (CHIMIE)

**VALORISATION DES EXTRAITS DE PIN GRIS (*Pinus banksiana*)
PAR L'ÉTUDE DE LEUR COMPOSITION CHIMIQUE
ET DE LEURS ACTIVITÉS BIOLOGIQUES**

Avril 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.

À Alexandre

RÉSUMÉ

L'industrie forestière du Québec abandonne annuellement environ 10 millions de mètres cube de résidus forestiers sur les parterres de coupe. Les travaux de recherche ont été effectués à l'UQAC. Les travaux présentés dans ce mémoire tentent d'identifier par le truchement de l'analyse phytochimique de nouvelles substances bioactives à valoriser à même ces rejets de coupe.

Au total, 11 espèces d'essences ligneuses de la forêt boréale, réparties sur deux récoltes, ont été testées pour l'activité anticancéreuse, antibiotique, antioxydante et antifongique de leurs bois. Les résultats d'analyse nous ont amené à concentrer l'effort sur le *Pinus banksiana* qui démontrait une très bonne réponse aux tests anticancéreux.

Au cours des travaux, dix molécules comprenant entre autre des flavonoïdes (la pinobanksine ainsi que sont dérivé acétate, la pinocembrine), et des acides résiniques hydroxylé ont été isolées par diverses techniques chromatographiques, identifiées par résonance magnétique nucléaire et testées sur des cultures de cellules pour déterminer la ou les molécules responsables de l'activité anticancéreuse observée sur les extraits bruts.

REMERCIEMENTS

Au terme de plusieurs mois de recherche, je remercie du fond du cœur les personnes qui m'ont soutenu dans cette recherche, en particulier :

- Vakhtang Mshvildadze, pharmacognosiste profondément géorgien;
- Serge Lavoie, l'homme orchestre, pour son support indéfectible;
- François Simard, mon modèle au quotidien et colocataire à Marseille;
- Carole Grenon, pour l'aide apportée en HPLC;
- Professeur Riad Elias, qui a généreusement partagé son savoir et son temps lors de mon stage à Marseille.

Je ne peux non plus oublier la contribution d'André Barrette, Hélène Gagnon, Maxime Lebrun, Catherine Dussault, Josette Ross, Tommy Perron, Marie-Eve Bradette-Hébert et Dominic Dufour.

Enfin, je remercie André Pichette et Jean Legault, mes directeurs de recherche, pour la liberté dont j'ai bénéficié tout au long de ce projet et pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
INTRODUCTION	13
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	20
1.1 Description morphologique	21
1.2 Habitat et distribution	21
1.3 Utilisation par l'industrie forestière	22
1.4 Compositions chimiques connues des parties de <i>Pinus banksiana</i>	23
1.4.1 La résine	24
1.4.2 L'écorce	24
1.4.3 Les aiguilles	24
1.4.4 Le bois	25
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE	29
2.1 La récolte et la préparation	30
2.1.1 La récolte du matériel végétal	30
2.1.2 La préparation du bois	30
2.1.3 Le broyage	31
2.2 Les extractions des produits naturels	31

2.2.1	Extractions au Soxhlet à petite échelle (50 g)	31
2.2.2	Extractions au Soxhlet à grande échelle (400 g)	33
2.2.3	Extractions effectuées à la sonde ultrason.....	35
2.3	Le criblage biologique et biochimique	35
2.3.1	Évaluation de l'activité anticancéreuse	36
2.3.2	Évaluation de l'activité antibiotique	37
2.3.3	Évaluation de l'activité antifongique	37
2.3.4	Évaluation de l'activité antioxydante	38
2.4	La chromatographie	35
2.4.1	La nomenclature des échantillons	38
2.4.2	La chromatographie sur couche mince.....	39
2.4.3	La chromatographie sur colonne	40
2.4.4	La chromatographie en phase gazeuse	41
2.4.5	La chromatographie liquide haute performance.....	42
2.5	La spectroscopie	44
2.5.1	La spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire.....	45
CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		46
3.1	Extractions	47
3.1.1	Résultats des extractions de la première cueillette.....	47
3.1.2	Résultats des extractions de la seconde cueillette	47
3.1.3	Rendements des extractions avec la sonde à ultrason	48
3.1.4	Rendements des extractions à grande échelle (Soxhlet 400 g)	49

3.2	Criblage biologique et biochimique.....	49
3.2.1	Résultats du criblage biologique de la première cueillette.....	49
3.2.2	Résultats du criblage biologique de la seconde cueillette	51
3.3	Choix de l'espèce.....	56
3.4	Résultats de chromatographie.....	56
3.4.1	Isolation des composés de l'extrait dichlorométhane	56
3.4.2	Purification de l'extrait à l'hexane	61
3.5	Résultats de spectroscopie : identification des molécules	64
3.5.1	CS1CA et CS1EB : le matairésinol.....	64
3.5.2	CS1BB : la pinosylvine monométhyle éther	65
3.5.3	CS1CB : la pinocembrine.....	65
3.5.4	CS1CC : l'acétate de pinobanksine.....	66
3.5.5	CS1EA : le pinorésinol.....	66
3.5.6	CS1EC : la pinobanksine.....	67
3.5.7	CS6CC : l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique	68
3.5.8	CS6CD : l'acides 13-keto-8(14)-podocarpenoïque.....	68
3.5.9	CS6CF : l'acide 12-hydroxyabiétique.....	69
3.5.10	CS6CH : l'acide imbricatolique	70
3.6	Bioactivité des molécules isolées	70

CONCLUSION.....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	75
ANNEXE 1 Liste des abréviations	84
ANNEXE 2 Identification RMN des molécules.....	86
CS1CA et CS1EB : Matairésinol.....	87
CS1CB : Pinocembrine	88
CS1CC : Acétate de pinobanksine	89
CS1EB : Pinorésinol	90
CS1EC : Pinobanksine	91
CS6CC : Acide 15-hydroxydehydroabiÉtique.....	92
CS6CD : Acide 13-keto-8(14)-podocarpenoïque	93
CS6CE : Acide 12-hydroxyabiÉtique	94
CS6CH : Acide imbricatolique	95

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : <i>PINUS BANKSIANA</i> LAMBERT	21
FIGURE 2 : DISTRIBUTION DU <i>PINUS BANKSIANA</i> LAMB. [THOMPSON, 1999]	22
FIGURE 3 : STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE LA PINOBANKSINE	23
FIGURE 4 : STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE L'ACIDE 13-KETO-8(14)PODOCARPEN-18-OÏQUE	25
FIGURE 5 : STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE LA PINOSYLVINE.....	25
FIGURE 5 : STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE LA CONIFÉRINE-E	26
FIGURE 7 : SCHÉMA DE L'EXTRACTION AU SOXHLET	32
FIGURE 8 : MONTAGE DU SOXHLET DE 400 G	34
FIGURE 9 : SCHÉMA DE PURIFICATION DE L'EXTRAIT AU DICHLOROMÉTHANE.....	57
FIGURE 10 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCES SUR GEL DE SILICE DES FRACTIONS 1A À 11 (CHCl ₃ : MeOH 40 : 1; VANILLINE).....	58
FIGURE 11 : CHROMATOGRAMME GC/MS DE LA FRACTION 1B.....	59
FIGURE 12 : CHROMATOGRAMME HPLC PRÉPARATIF DE LA FRACTION 1C	60
FIGURE 13 : CHROMATOGRAMME HPLC DE LA FRACTION 1E	61
FIGURE 14 : SCHÉMA DE PURIFICATION DE L'EXTRAIT À L' HEXANE.....	62
FIGURE 15 : CHROMATOGRAMME HPLC DE LA FRACTION CS6C	64

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : MOLÉCULES IDENTIFIÉES À PARTIR DE <i>PINUS BANKSIANA</i> , SELON LA FAMILLE, 1930-2007	27
TABLEAU 2 : CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT DICHLOROMÉTHANE BRUT.....	40
TABLEAU 3 : CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT HEXANE DU BOIS DE PIN GRIS	41
TABLEAU 4 : PARAMÈTRE D'UTILISATION DU GC/MS.....	42
TABLEAU 5 : CONDITION EN HPLC ANALYTIQUE UTILISÉ POUR L'ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON 1C	43
TABLEAU 6 : CONDITION EN HPLC ANALYTIQUE UTILISÉ POUR L'ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON CS6C	43
TABLEAU 7 : CONDITIONS HPLC UTILISÉES POUR L'ISOLATION DES COMPOSÉS DE LA FRACTION 1C	44
TABLEAU 8 : RENDEMENTS OBTENUS AVEC L'APPROCHE SÉQUENTIELLE D'EXTRACTION POUR LES DIFFÉRENTS BOIS DE LA PREMIÈRE CUEILLETTE	47
TABLEAU 9 : RENDEMENTS DES EXTRACTIONS DE LA SECONDE CUEILLETTE.....	48
TABLEAU 10 : RÉSULTATS IC ₅₀ DES TESTS D'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DE LA PREMIÈRE CUEILLETTE.....	51
TABLEAU 11 : RÉSULTATS IC ₅₀ DES TESTS D'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DE LA DEUXIÈME CUEILLETTE.....	52
TABLEAU 12 : RÉSULTATS DES INDICES ORAC ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE SUR CELLULE POUR LES EXTRAITS DE LA SECONDE CUEILLETTE	54

TABLEAU 13 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DE PLUSIEURS ESPÈCES DE LA FORÊT BORÉALE RÉSULTATS DES TESTS ANTIBACTÉRIENS D'EXTRAITS DE LA SECONDE CUEILLETTE	55
TABLEAU 14 : MASSE ET VALEUR D'IC ₅₀ DE L'EXTRAIT À L'HEXANE ET DES DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES LORS DE LA PURIFICATION PRIMAIRE	63
TABLEAU 15 : ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES MOLÉCULES ISOLÉES.....	71

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Deux ordres de préoccupation se rencontrent dans ce mémoire et lui donnent sa substance. Le premier a trait à la maladie et à la recherche incessante de l'homme qui, observant la nature et les effets de ses propres expériences, a depuis longtemps découvert que le *monde végétal* est porteur d'une multitude de solutions aux problèmes de santé qui affligent les humains.

Le deuxième se rapporte au fait que l'industrie forestière exploite massivement l'univers végétal de la forêt boréale, y laissant comme *résidu* une proportion majeure de biomasse coupée sans qu'on se soit assuré que ces résidus – que l'on perçoit d'emblée comme un problème – fassent plutôt partie de l'ordre des solutions.

Reliant les deux ordres de préoccupation énoncés, le sujet de ce mémoire rejoint donc l'interrogation globale suivante :

« Les matières ligneuses qui jonchent si abondamment les parterres de coupe recèlent-elles, en qualité et en quantité, des molécules utiles à notre lutte contre la maladie? »

Le monde végétal comme réponse à la maladie

La quête de remèdes au sein du règne végétal date de plusieurs millénaires. Venant en cela appuyer la transmission orale des savoirs, l'écriture a grandement contribué au transfert

intergénérationnel des connaissances empiriques sur les plantes médicinales. Le papyrus médical d'Ebers, rédigé environ 1500 ans avant J. C., compte parmi les premiers écrits consacrés à l'usage thérapeutique des plantes [Wichtl, 1999]. Depuis lors, de nombreux ouvrages ont servi au fil des siècles à soigner les maux qui affligent l'espèce humaine. Ces savoirs empiriques, transmis oralement ou par écrit, trouvent aujourd'hui une nouvelle vie dans le contexte du développement des techniques de la chimie analytique moderne.

En effet, depuis le 19^e siècle, les scientifiques s'appliquent à isoler les molécules responsables de l'activité médicamenteuse des plantes. En 1804, un scientifique allemand nommé Rose isole l'inuline [Tungland, 2000]. Quelques années plus tard, en 1817, c'est au tour de la morphine par Sertürner, puis de la codéine par Robiquet en 1832. Juste après, Paria identifie l'acide salicylique en 1838. Plusieurs de ces molécules extraites des végétaux ont grandement contribué à la pharmacothérapie. La morphine, issue du pavot, devient le premier analgésique central; la cocaïne s'avère un anesthésique local; l'éphédrine, principe actif de l'éphédra, a mené aux dérivés amphétaminiques. La rauwolfia a conduit à la réserpine utilisée comme antihypertenseur et antidépresseur. La famille des solanacées a mené à l'extraction de l'atropine, un antispasmodique puissant [Chalandre, 1999].

Les produits naturels d'origine végétale sont largement utilisés à des fins thérapeutiques. On estime que plus de 60% de la population mondiale contemporaine a eu recours à de la médication issue du règne végétal. Les produits naturels d'origine végétale occupent également une part importante du marché pharmaceutique. En 1999, neuf des vingt médicaments les plus vendus provenaient d'extraction végétale. Ces médicaments

représentent annuellement des ventes de 16 milliards de dollars US [Harvey, 2000]. La recherche de nouveaux médicaments à l'intérieur de ce règne est loin d'être arrivée à terme^a. À ce jour, moins de 15% des 250 000 espèces connues du règne végétal auraient fait l'objet d'analyse visant à y déterminer la présence de molécules bioactives [Balandrin et al., 1993].

La valorisation des résidus forestiers

Le contexte économique et les préoccupations environnementales partagées par un nombre grandissant de citoyens et d'autres acteurs incitent l'industrie forestière à évoluer. Ainsi, de nombreux changements s'introduisent dans ses méthodes de travail qui deviennent plus conciliables avec la perspective d'une exploitation durable de la ressource.

L'industrie forestière québécoise s'intéresse presque uniquement au bois de certaines espèces (épinette noire, épinette blanche, pin gris, bouleau blanc, bouleau jaune, sapin baumier, etc.). L'industrie exploite une quantité importante de matière ligneuse. Elle coupe annuellement 30,9 millions de mètres cube de résineux pour l'industrie papetière et de construction ainsi que 7,9 millions de mètres cube de feuillus [Coulombe, 2005]. Sur l'ensemble de la biomasse ainsi récoltée, 27% est inutilisée et laissée sur le parterre de coupe. À terme, 55% seulement du volume prélevé sur la biomasse forestière se retrouve sur le marché sous forme de fibre ou de planche. Il devient donc urgent de vérifier si certaines essences végétales, dont on abandonne des milliers de tonnes sur place chaque

^a En 2005, le marché mondial des médicaments à base de taxanes était estimé à 4 milliards \$ US (BioxelPharma inc, 2006).

année à titre de résidu, ne pourraient pas devenir une source pour le développement de produits à haute valeur ajoutée.

Les produits forestiers non-ligneux au Canada

Le prélèvement de matière végétale non ligneuse occupe une place marginale comparée à celle de matière ligneuse. L'acériculture produit tout de même 25 millions de litres de sirop d'érable par an. La récolte de bleuets et la production de sapin de Noël s'avèrent aussi des activités économiques non négligeables. À cela, il faut ajouter la récolte de ginseng, d'if du Canada, de la gomme de sapin, des huiles essentielles, et d'autres produits par les industries nutraceutique et pharmaceutique [Coulombe, 2005]. Cette industrie génère des retombées estimées à 241 millions de dollars par année au Québec. Seulement en Colombie Britannique, 200 produits forestiers non ligneux font l'objet d'une exploitation. À l'échelle canadienne, ce chiffre atteindrait 500 produits [Deschesne, 2003]. De façon générale, les produits forestiers non ligneux ont une grande valeur par rapport au volume récolté.

La province de Québec est un endroit de prédilection pour la recherche de molécules bioactives d'origine végétale. Le territoire québécois comporte environ 1875 espèces de plantes vasculaires indigènes [Gagnon, 2004].

Utilisation en médecine traditionnelle du pin gris (*Pinus banksiana*)

Le pin gris est une espèce très abondante dans la forêt boréale. Diverses tribus amérindiennes ont, traditionnellement, fait usage des différentes parties du pin gris. Les

Cree du Woodland utilisaient des compresses faites avec des morceaux d'écorce interne pour soigner les coupures profondes. Les amérindiens de Potawatomi utilisaient la résine des cônes bouillis en onguent pour toutes sortes de maux. La fumée dégagée par les aiguilles était un remède utilisé contre la congestion des poumons. Cette même fumée permettait d'éveiller des malades comateux. [Moerman, 1998]. Kunkel confirme que la plante et ses graines sont comestibles. Ses jeunes aiguilles sont utilisées pour faire un thé très riche en vitamines [Kunkel, 1984]. Plusieurs maux étaient également traités à l'aide d'autres essences de pins comme diurétique, pour traiter la vessie, les reins et les rhumatismes [Grieves, 1967].

Problématique et objectifs

Depuis près de dix ans, le *Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE)* de l'UQAC poursuit des travaux de recherche et développement ayant notamment pour objet de valoriser la biomasse résiduelle engendrée par les activités de coupe de l'industrie en forêt boréale. Les travaux et les résultats présentés dans ce mémoire s'inscrivent à l'intérieur de ce vaste programme de développement et de mise en valeur des connaissances sur les essences forestières des écosystèmes boréaux.

Dans le cadre de ce projet, le potentiel anticancéreux du bois de quatre espèces de résineux, en l'occurrence le *Pinus banksiana*, le *Pinus strobus*, le *Pinus resinosa* et le *Thuja occidentalis* a été évalué sur des cellules en culture. Le second volet de ce projet consistait à isoler et à identifier les molécules responsables de l'activité anticancéreuse des extraits démontrant le meilleur potentiel anticancéreux.

Pour contribuer au développement de la base de connaissances du laboratoire LASEVE, un criblage plus étendu au plan des essences échantillonnées et des types de bioactivité vérifiés a aussi été effectué. Les huit espèces échantillonnées correspondent à des essences exploitées par l'industrie forestière : *Thuja occidentalis*, *Pinus banksiana*, *Abies balsamea*, *Populus tremuloïdes*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera*, *Picea mariana*, *Picea glauca*. Les échantillons sont ensuite traités selon des techniques similaires à celles appliquées dans la première partie du projet. Les extraits soumis aux tests d'activité anticancéreuse, antifongique, antibactérienne et antioxydante doivent permettre l'acquisition de résultats utiles aux travaux ultérieurs de valorisation menés par le groupe de recherche.

CHAPITRE 1
REVUE DE LITTÉRATURE

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE



Figure 1 : *Pinus banksiana* Lambert

Le pin gris est un conifère de la famille des pinacées. Sa forme et sa hauteur dépendent de son habitat, en particulier de la composition du sol. Dans un sol sablonneux et riche, sa hauteur peut atteindre 20 mètres et le diamètre de son tronc presque 60 centimètres. Cependant, les individus mesurent de 12 à 18 mètres et ont un diamètre variant entre 20 et 30 centimètres [Hosie, 1979]. Le pin gris est une espèce adaptée au feu. En effet ses cônes éclatent à la grande chaleur d'un incendie et dispersent leurs graines capables de germer en moins de 10 jours [Marie-Victorin, 1995].

1.2 HABITAT ET DISTRIBUTION

À l'échelle du Canada, le pin gris présente une vaste distribution. De l'Île du Cap Breton en Nouvelle-Écosse jusqu'à la rivière Mackenzie dans les Territoire du Nord-Ouest, les

peuplements mixtes ou purs de pin gris s'étendent sur de vastes étendues du territoire canadien [Rudolph, 1990].

Le pin gris est un arbre essentiellement boréal qui pénètre très loin au nord, presque à la limite des arbres dans la péninsule labradorienne. Le sol du Saguenay-Lac-Saint-Jean est un endroit propice à la prolifération des peuplements de pin gris. Les sols composés d'alluvions et de sable lui conviennent. Il est absent dans les régions calcaires et argileuses. Le pin gris manifeste une préférence pour les terrains siliceux brûlés. On le retrouve en grande quantité dans la région de l'Abitibi et dans les zones siliceuses de Kamouraska [Marie-Victorin; 1995].

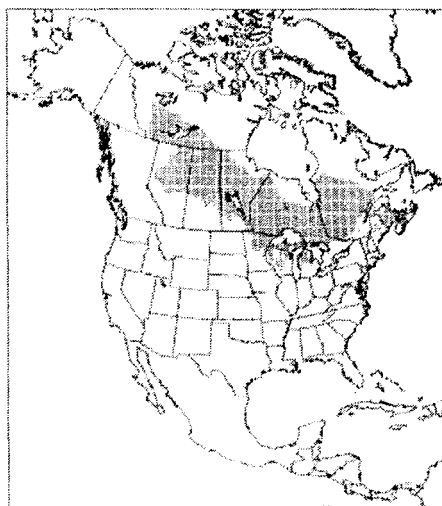


Figure 2 : Distribution du *Pinus banksiana* Lamb. [Thompson, 1999]

1.3 UTILISATION PAR L'INDUSTRIE FORESTIÈRE

Le pin gris représente 10 % du volume des résineux coupés par l'industrie forestière. Il sert de bois de charpente, de traverses de chemin de fer, de poteaux et est utilisé plus

marginale par la fabrication du papier. Depuis quelques années, l'industrie forestière québécoise replante jusqu'à 31,6 millions de plants de pin gris par année, ce qui représente environ 20 % de son effort de reboisement. Depuis 25 ans, 450 millions de plants ont été mis en terre. L'un des freins à l'utilisation plus importante du pin gris par l'industrie des pâtes et papier tient à la présence de pinobanksine (Figure 3) un composé dans le bois qui entraîne une coloration jaunâtre du papier [Chapman, 1974; Law, 1994].

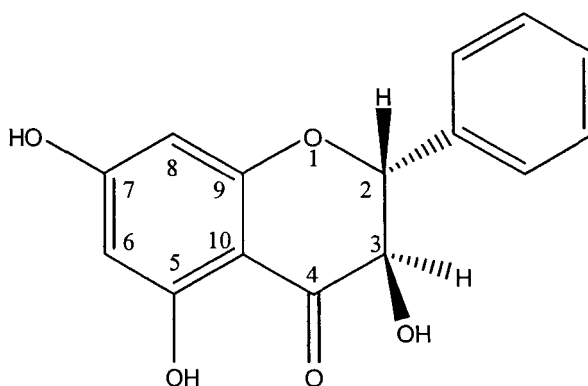


Figure 3 : Structure moléculaire de la pinobanksine

1.4 COMPOSITIONS CHIMIQUES CONNUES DES PARTIES DE *PINUS BANKSIANA*

Les premières publications touchant la composition chimique du pin gris ont paru dans les années 1930. On trouvera au tableau 1 une synthèse des principales molécules isolées dans les différentes parties de *Pinus banksiana* de 1930 à nos jours.

1.4.1 La résine

Les premières molécules isolées de la résine du pin gris furent des acides résiniques, des acides gras et des stérols (tableau 1). La résine contient aussi une certaine quantité de monoterpènes volatils [Hippert, 1931].

1.4.2 L'écorce

Les travaux sur l'écorce ont conduit à l'identification d'un bon nombre de terpènes. Cette partie de l'arbre semble très riche en diterpènes, surtout en acides résiniques (tableau 1).

1.4.3 Les aiguilles

Depuis une trentaine d'années, des chercheurs canadiens tentent de comprendre pourquoi *Neodiprion rufifrons* et *Neodiprion swaini* se nourrissent presque exclusivement d'aiguilles matures plutôt que des aiguilles issues de l'année. Ces chercheurs ont postulé que les compositions chimiques des « vieilles » aiguilles et des aiguilles d'un an étaient différentes. C'est ainsi qu'ils ont constaté des variations dans la composition en acides résiniques des aiguilles. Par différents tests biologiques, ils ont identifié l'acide 13-keto-8(14)podocarpène-18-oïque (figure 4) comme étant la molécule responsable de ce choix par les insectes [Ikeda, 1977]. Des acides phénoliques ainsi que des acides résiniques ont aussi été isolés à partir des aiguilles (voir tableau 1).

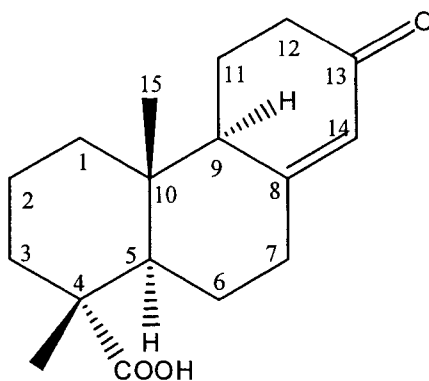


Figure 4 : Structure moléculaire de l'acide 13-keto-8(14)podocarpene-18-oïque

1.4.4 Le bois

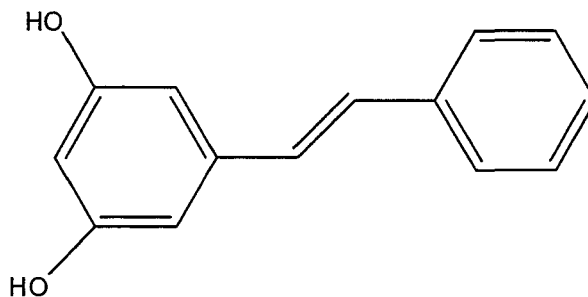


Figure 5 : Structure moléculaire de la pinosylvine

Les premiers polyphénols ont été isolés en 1943 par Erdtman. En 1951, l'équipe de Lindstedt confirma la présence de trois polyphénols et isola à son tour un stilbène bien connu, la pinosylvine (Figure 5). En 1963, des progrès majeurs furent réalisés par Rudloff et Sato. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de bois de cœur mit en évidence 17 composés volatils. Onze de ces pics étaient identifiés comme des monoterpènes (voir tableau 1). L'extrait acétonique du bois de pin gris a une composition assez complexe. Trois types de molécules furent isolés : les phénoliques, les acides ainsi que les glycérides. La présence de coniférine-E (Figure 6) et de sucre apparaît aussi au

tableau 1. Des travaux parus en 2004 montrent la relation entre l'activité antibactérienne de l'extrait acétonique du bois et la présence de stilbènes [Lindberg, 2004].

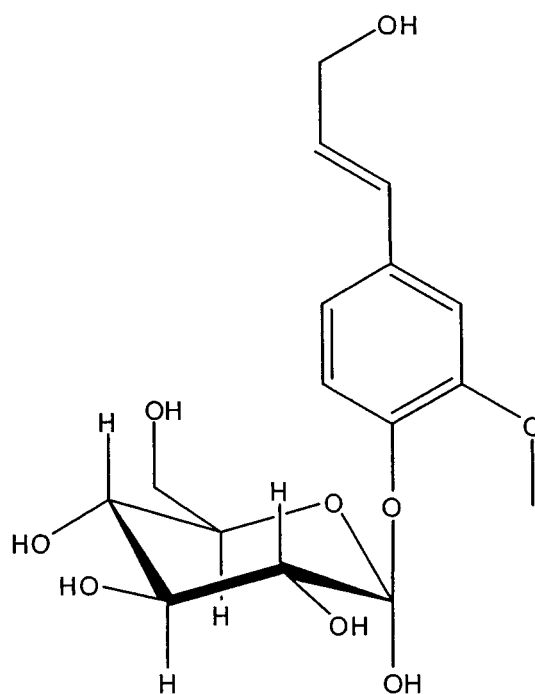


Figure 6 : Structure moléculaire de la coniférine-E

Tableau 1 : Molécules identifiées à partir de *Pinus banksiana*, selon la famille, 1930-2007

Famille	Nom	Partie	Référence
Acide gras	acide oléique	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Bois	[Rudloff, 1963]
	acide linoléique	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Bois	[Rudloff, 1963]
	acide linolénique	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
	acide lignocérique	Résine	[Buchanan et al, 1959].
	acide linolénique	Bois	[Rudloff, 1963]
	acide palmique	Bois	[Rudloff, 1963]
	acide stéarique	Bois	[Rudloff, 1963]
Flavanoïde	pinocembrine	Bois	[Erdtman, 1943].
	pinobanksine	Bois	[Erdtman, 1943].
	quercetin	Écorce	[Rowe, 1971]
	6-methylquercetine	Écorce	[Rowe, 1971]
	6-methylmyricetin	Écorce	[Rowe, 1971]
	dihydroquercetine	Écorce	[Rowe, 1971]
	dihydromyricetin	Écorce	[Rowe, 1971]
	catechol	Écorce	[Rowe, 1971]
	vanillin	Écorce	[Rowe, 1971]
Phénylpropane	coniférine-E	Bois	[Savidge, 1989]
	acide ferrulique	Écorce	[Bower, 1969]
Stilbène	monométhyle éther de pinosylvine	Bois	[Erdtman, 1943].
		Écorce	[Bower, 1966]
	pinosylvine	Bois	[Lindstedt, 1951]
	cis-monométhyléther de pinosylvine	Écorce	[Rowe, 1969]
	trans-monométhyléther de pinosylvine	Écorce	[Rowe, 1969]
Sucre	arabinose	Bois	[Hattonm, 1993]
	xylose	Bois	[Hattonm, 1993]
	mannose	Bois	[Hattonm, 1993]
	galactose	Bois	[Hattonm, 1993]
	glucose	Bois	[Hattonm, 1993]
Autres métabolites	acide malique	Aiguille	[Sarkar, 1979]
	acide quinique	Aiguille	[Sarkar, 1979]
	acide shikimique	Aiguille	[Sarkar, 1979]
	acide syringique	Aiguille	[Sarkar, 1979]
	acide benzoïque	Bois	[Rudloff, 1963]
	glycérol	Bois	[Rudloff, 1963]
	vanillin	Écorce	[Rowe, 1971]

Famille	Nom	Partie	Référence
Monoterpène	α -pinène	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Bois	[Rudloff, 1963]
	L- β -pinène	Résine	[Haagen-Smit et al, 1950]
		Bois	[Rudloff, 1963]
	camphène	Bois	[Rudloff, 1963]
	myrcène	Bois	[Rudloff, 1963]
	limonène	Bois	[Rudloff, 1963]
	β -phellandrène	Bois	[Rudloff, 1963]
	γ -terpinène	Bois	[Rudloff, 1963]
	cis-p-Menthan-8-ol	Bois	[Rudloff, 1963]
Diterpène	α -terpinol	Bois	[Rudloff, 1963]
	agathadiol	Écorce	[Bower, 1966]
	torulosol	Écorce	[Bower, 1966]
	13-épitrorulosol	Écorce	[Bower, 1966]
	oxyde de manoyl	Écorce	[Bower, 1966]
		Bois	[Pichette, 1998]
	(+)-13-epimanoyl oxide	Écorce	[Bower, 1966]
	(-)-13-epimanoyl oxide	Écorce	[Bower, 1966]
	dehydroabietol	Écorce	[Bower, 1969]
	18-norabieta-8,11,13-trien-4-ol	Écorce	[Rowe, 1971]
	19-norabieta-8,11,13-trien-4-ol	Écorce	[Rowe, 1971]
	pimaradiène	Écorce	[Rowe, 1971]
	isopimaradiène	Écorce	[Rowe, 1971]
	δ -cadinène	Écorce	[Rowe, 1971]
	dehydrojuvabione	Bois	[Pichette, 1998]
	manool	Bois	[Pichette, 1998]
	Z-abienol	Bois	[Pichette, 1998]
	isoabienol	Bois	[Pichette, 1998]
	néoabienol	Bois	[Pichette, 1998]
	pimaral	Bois	[Pichette, 1998]
Acide résinique	7-ketodehydroabietol	Écorce	[Bower, 1969]
	acide abiétique	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Bois	[Rudloff, 1963]
		Aiguille	[Beth, 1984]
	acide pimarique	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Bois	[Rudloff, 1963]
	acide sandaracopimarique	Bois	[Rudloff, 1963]
		Aiguille	[Ikeda, 1977]
	acide isopimarique	Bois	[Rudloff, 1963]
		Aiguille	[Beth, 1984]
	acide déhydroabiétique	Bois	[Rudloff, 1963]
		Écorce	[Bower, 1969]
		Aiguille	[Ikeda, 1977]
	acide 7-ketodehydroabietique	Écorce	[Bower, 1969]
	acide néoabiétique	Bois	[Rudloff, 1963]
		Aiguille	[Ikeda, 1977]
	acide 13-keto-8(14)podocarpén-18-ol	Aiguille	[Ikeda, 1977]
	acide levopimarique	Aiguille	[Ikeda, 1977]
	acide palustrique	Aiguille	[Ikeda, 1977]
Stérol	phytostérol	Résine	[Hibbert and Phillips 1931]
		Écorce	[Bower, 1966]
	campesterol	Écorce	[Bower, 1966]
	dihydrocampesterol	Écorce	[Bower, 1966]
	β -sitosterol	Bois	[Rudloff, 1963]
	Δ^4 -stigmastèn-3-one	Écorce	[Bower, 1966]
Triterpène	Δ^4 -campesten-3-one	Écorce	[Bower, 1966]
	serratenèdiol	Écorce	[Bower, 1966]
	episerratenèdiol	Écorce	[Bower, 1966]
	diepiserratenèdiol	Écorce	[Bower, 1966]
	episerratenèdiol-21 monométhyl éther	Écorce	[Bower, 1966]

CHAPITRE 2
MÉTHODOLOGIE

MÉTHODOLOGIE

2.1 LA RÉCOLTE ET LA PRÉPARATION

2.1.1 La récolte du matériel végétal

La première partie du matériel végétal a été récoltée le 18 mai 2004 soit *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. resinosa* et *Thuja occidentalis*. Ces espèces ont été prélevées à la station de recherche de Simoncouche, 48°14'38.43"N, 71°15'15.51"O, ainsi qu'au lac des Îlets, 48°12'13.40"N, 71°14'57.99"O. Quatre individus par espèce ont été récoltés afin d'avoir un échantillonnage représentatif et ainsi minimiser l'impact des différences individuelles. Les arbres furent ébranchés, coupés en billots de 1 m et entreposés dans un réfrigérateur à 4°C.

La seconde récolte a eu lieu le 5 mai 2005 pour un criblage biologique plus étendu, en vue de travaux futurs. Huit espèces ont été prélevées : *Thuja occidentalis*, *Pinus banksiana*, *Abies balsamea*, *Populus tremuloïdes*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera*, *Picea mariana*, et *Picea glauca*. Ces échantillons ont été récoltés sur le même site que la première cueillette et transportés à l'UQAC.

2.1.2 La préparation du bois

L'écorçage des billots à l'aide d'une plane a permis d'obtenir le bois. Les billots ont été découpés en tranches minces au moyen d'une scie à ruban. Les tranches de bois furent ensuite placées une journée dans une étuve Theko Model 18, à une température variant entre 40°C et 50°C. Un ciseau à bois a ensuite été utilisé pour réduire les tranches de bois en morceaux afin d'être en mesure d'introduire le bois dans le broyeur.

2.1.3 Le broyage

Le broyage des morceaux de bois en fine poudre fut réalisé à l'aide d'un broyeur de marque Fritsch, modèle D-55743. Le tamis utilisé laissait passer des particules d'une grosseur maximale de 2 mm. La poudre végétale ainsi récupérée a été placée dans des sacs de papier. Sur ces sacs sont identifiés le nom de l'espèce, le numéro d'individu (1 à 4) et la date de la récolte. La poudre végétale fut ensuite conservée dans un congélateur à -20°C.

2.2 LES EXTRACTIONS DES PRODUITS NATURELS

Au fil du projet, différents types d'extraction ont été effectués. L'extraction utilisait une quantité égale de poudre végétale pour chaque individu afin de réduire la variation interindividuelle. Les extractions servant au criblage biologique ont été effectuées au Soxhlet avec une cartouche contenant approximativement 50 g de matériel végétal, tel que décrit à la section 2.2.1 ci-dessous. Pour obtenir une quantité suffisante d'extrait, l'extraction du *Pinus banksinana*, espèce choisie pour l'analyse phytochimique, fut accomplie à l'aide d'un Soxhlet de 400 g (section 2.2.2 ci-dessous). Quelques expérimentations ont été effectuées avec une sonde ultrasonique dans le but d'optimiser les rendements d'extraction. Les détails de ces expériences sont décrits à la section 2.2.3 ci-dessous.

2.2.1 Extractions au Soxhlet à petite échelle (50 g)

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Les

extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante (figure 7). Les solvants utilisés étaient l'hexane, le dichlorométhane, le méthanol et l'eau. Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale.

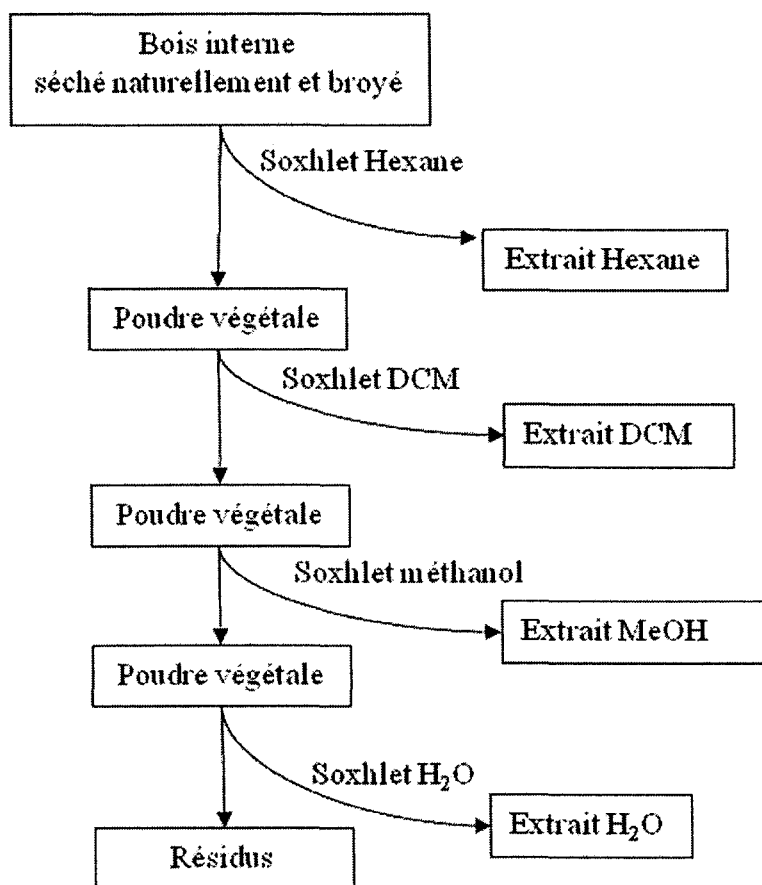


Figure 7 : Schéma de l'extraction au Soxhlet

Les joints de verre frittés du montage étaient recouverts de ruban de téflon pour empêcher les fuites et diminuer les pertes de solvant. Le montage a été réalisé à l'aide d'un ballon de 250 ml, d'un Soxhlet de 60 mm de diamètre, d'un réfrigérant ainsi que d'une cartouche de cellulose (Whatmann, 60 x 180 mm) contenant la matière végétale broyée.

L'expérience nécessitait 700 ml de solvant. Une petite quantité de pierre ponce servait à régulariser l'ébullition. La mante chauffante était utilisée à une puissance correspondant à 70 % de sa capacité. Après le passage de chaque solvant, la cartouche séchait 24 heures à l'étuve à 40°C. Les extraits étaient ensuite évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait aqueux était, pour sa part, lyophilisé grâce à un appareil de marque Labconco, modèle 6 l.

2.2.2 Extractions au Soxhlet à grande échelle (400 g)

Même si le principe reste identique, l'extraction au Soxhlet de 400 g présente plusieurs différences. Premièrement, un système de fixation permanent était nécessaire pour immobiliser le montage. La verrerie requise comprenait un ballon de 4 l, le Soxhlet de 400 g et un réfrigérant de 40 cm. Les joints de verre frittés étaient recouverts de ruban de téflon. Les cartouches utilisées étaient des Whatmann 90mm x 200mm. Trois litres de solvant et des pierres à ébullition étaient nécessaires pour assurer le bon fonctionnement du système de retour du solvant. Le fort volume de solvant et la grosseur du système augmentait considérablement le temps requis pour faire le premier cycle. Des bandelettes isolantes servaient à recouvrir la partie inférieure du Soxhlet. Ces bandelettes assuraient une certaine isolation et contribuaient à diminuer l'emballement de l'ébullition difficile à contrôler avec ce système. La régulation thermique de la mante exigeait beaucoup de précision et d'attention pour maintenir le point d'ébullition, tout en empêchant qu'elle ne s'emballe et provoque des projections.

L'extraction sur de grandes quantités de bois impliquait deux solvants, hexane et dichlorométhane. Pour l'extraction séquentielle cependant, tout le matériel a d'abord été extrait à l'hexane et ensuite au dichlorométhane. Cette procédure a permis de diminuer la quantité de solvant utilisée puisque le changement de solvant s'effectuait tous les trois jours, plutôt que sur une base quotidienne. Le matériel végétal était remplacé tous les jours. Un litre de solvant était ajouté quotidiennement pour compenser les pertes imputables aux fuites du système. Pour extraire les 10 kg de matrice végétale, 22 jours d'extraction à l'hexane et 22 jours d'extraction au dichlorométhane ont été requis. Le solvant était éliminé des extraits par évaporateur rotatif suivi d'un séjour sur la pompe à vide.



Figure 8 : Montage du Soxhlet de 400 g

2.2.3 Extractions effectuées à la sonde ultrason

L'extraction des produits naturels en utilisant les ultrasons a été envisagée afin d'améliorer le rendement et/ou la vitesse de cette étape. Les pulsations émises par la sonde à ultrasons permettent souvent d'obtenir de meilleurs rendements car elles favorisent le bris des parois cellulaires cellulodiques. Dans un erlenmeyer de 500 ml, 50 g de bois était mis en contact avec 500 ml d'hexane. La sonde à ultrasons de marque Sonifer, modèle Cell Disruptor 350 W, a été réglée en mode continu et la puissance ajustée à 70 W. La sonde était plongée dans la solution pendant 30 minutes. La solution était ensuite filtrée pour séparer le filtrat de la matière végétale. Celle-ci était séchée et ré-extraite avec dichlorométhane selon le même protocole. Une tentative non séquentielle, avec dichlorométhane seulement, a aussi été testée. Les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide et les masses des extraits déterminées afin d'évaluer les rendements d'extraction.

2.3 LE CRIBLAGE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

Les solutions mères des extraits et des fractions ont été préparés à une concentration de 80 mg/ml tandis que les molécules pures étaient préparées à 80 mM. Les solvants utilisés pour dissoudre ces échantillons étaient le méthanol et le DMSO. Des séries de dilutions successives avec du milieu de culture ont été préparées pour chaque échantillon (400 à 3.125 $\mu\text{g/ml}$ ou μM) et 100 μL de chacune des concentrations ont été ajoutés aux cellules à tester.

2.3.1 Évaluation de l'activité anticancéreuse

Culture des cellules : les lignées cellulaires humaines suivantes ont été utilisées pour cette étude: A549 (cancer du poumon), DLD-1 (adénocarcinome colorectal) et WS1 (fibroblastes de peau normale). Toutes les lignées ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, États-Unis). Les cellules A549, DLD-1 et WS1 ont été cultivées dans du « Minimum Essential Medium with Earle's salt ». Le milieu de culture a été complété avec 10% de sérum fœtal de veau, des solutions de L-glutamine (1X), de vitamines (1X), de pyruvate de sodium (1X), d'acides aminés non-essentiels (1X), de pénicilline (100 UI) et de streptomycine (100 mg / ml). Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée à 37 °C et 5% de CO₂

Test de cytotoxicité : les cellules à croissance exponentielle ont été inoculées avec une densité de 5×10^3 cellules par puits de microplaques 96 puits et 100 µL de milieu de culture ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées pendant 16 heures. Cent microlitres d'extrait (ou de composé pur) de concentrations croissantes a été ajoutés (voir ci-haut). La concentration finale de solvant dans le milieu de culture a été maintenue en deçà de 0,5% (v/v) afin d'éviter leur toxicité des solvants. Les cellules ont été incubées pendant 48 h, en l'absence ou en présence de l'extrait. La cytotoxicité a été évaluée en utilisant le test de Hoechst qui quantifie la quantité d'ADN cellulaire. La fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 350 nm et à une longueur d'onde d'émission de 461 nm. La cytotoxicité est exprimée comme la concentration de l'extrait ou composés inhibant la

croissance des cellules de 50% (IC₅₀). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Sylvestre M., 2006]

2.3.2 Évaluation de l'activité antibiotique

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode décrite par [Banfi, 2006] avec quelques modifications. Brièvement, les bactéries à croissance exponentielle ont été inoculés dans des plaques 96 puits à fond rond. Les cellules ont été placées dans chaque puits des microplaques à une densité de 5×10^3 pour les *E. Coli* (gram-négatives, ATCC 25922) et à 25×10^3 pour les *S. aureus* (gram-positive, ATCC 25923) et 50 µl de bouillon nutritif (Difco) ont été ajoutés. Cent microlitres des produits à tester (concentrations croissantes) ont ensuite été ajoutés dans chaque puits en augmentant la concentration des extraits. Cinquante microlitres de résazurine 4% ont été ajoutés à chaque puits et les bactéries ont été incubées pendant 6 h à 37 ° C. La fluorescence a été mesurée après 6 h par un appareil automatisé pour la lecture de plaques 96 puits Fluoroskan Ascent à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm. L'activité antibiotique est exprimée comme la concentration de produit inhibant la croissance des cellules de 50% (IC₅₀). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Pichette A., 2007]

2.3.3 Évaluation de l'activité antifongique

La levure utilisée pour le test d'activité antifongique était *Candida albicans*. Cette levure a un cycle de division de 3 heures. Comme pour les tests d'activité anticancéreuse, des plaques 96 puits ont étéensemencés et incubées jusqu'à confluence. Les produits à tester

ont déposés dans chaque puit de la même manière que pour les tests d'activité anticancéreuse

2.3.4 Évaluation de l'activité antioxydante

La procédure a été modifiée à partir de la méthode décrite par [Ou, 2001]. Le test ORAC a été effectué sur un Fluoroskan Ascent. Le trolox a été utilisé comme standard de contrôle. L'expérience a été menée à 37,5 °C et à un pH de 7,4, avec un échantillon témoin en parallèle. Le fluorimètre a été programmé pour enregistrer la fluorescence de la fluorescéine toutes les 30 s après l'addition du 2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate (AAPH). Les résultats finaux sont calculés en comparant la différence de l'aire sous la courbe de l'échantillon et celle du témoin. Les valeurs du test ORAC sont exprimées en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme (TE $\mu\text{mol} / \text{mg}$). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Mamelona M., 2007]

2.4 LA CHROMATOGRAPHIE

Plusieurs types de chromatographie ont été utilisés dans ce projet. La combinaison de diverses techniques de chromatographie permet d'obtenir des fractions purifiées et, ultimement, des molécules pures.

2.4.1 La nomenclature des échantillons

Les échantillons de ce projet ont tous un code unique qui permet de bien les identifier et de faciliter le retraçage. Le nom des échantillons commence toujours par les initiales de

l'expérimentateur suivi d'un chiffre (1 pour extrait DCM et 6 pour extrait hexane). Les lettres qui suivent correspondent au fractionnement dans l'ordre d'élution. Le nombre de lettres dépend du niveau de complexité de la fraction. Exemple : CS6CD : Il s'agit d'une fraction issue de l'extrait hexane (6) séparé 2 fois. La première lettre (C) indique qu'il s'agit de la troisième fraction et la seconde lettre indique que la fraction C a été refractionnée et qu'il s'agit de la quatrième fraction (D).

2.4.2 La chromatographie sur couche mince

Les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) de marque Silicycle sont recouvertes avec du gel de silice 60 et un indicateur fluorescent à 254 nm. Le milieu d'élution (chloroforme : méthanol, 50 : 1) (Wagner, 1984) était préparé puis ajouté dans la chambre et laissé une heure avant d'y faire migrer les plaques. Le milieu d'élution changeait selon les produits à analyser. Plus les produits étaient polaires, plus l'éluant était riche en méthanol. À l'aide d'une seringue, des dépôts de 15 µl d'une solution de 10mg/ml de l'extrait ou la fraction étaient effectués de façon linéaire sur la plaque. Les différents dépôts étaient espacés de 1 cm afin de prévenir la superposition des taches. Les plaques éluaient sur 7,5 cm lors des chromatographies sur colonne. Pour l'évaluation de la pureté des fractions, les plaques éluaient sur 15 cm pour obtenir une plus grande résolution.

Après migration, la plaque était séchée à l'air puis observée à l'aide d'une lampe UV à deux longueurs d'onde (254 nm et 366 nm). Les taches apparentes ont été notées au crayon plomb pour chaque longueur d'onde. La plaque était ensuite soumise à une pulvérisation d'une solution 1% de vanilline dans EtOH et une pulvérisation subséquente d'une solution

5% de H_2SO_4 dans EtOH. Les produits étaient ensuite révélés par chauffage de la plaque à 110°C dans une étuve.

2.4.3 La chromatographie sur colonne

A) Chromatographie de l'extrait dichlorométhane brut du bois de pin gris

Dans une colonne de 5,8 cm x 50 cm était ajouté un morceau de laine de verre qui empêchait le gel de silice de s'échapper par la valve. 400 g de gel de silice en suspension dans le chloroforme ont été utilisés pour le montage de la colonne. L'extrait (10 g) a été dissout dans 20 ml de chloroforme et le tout a été ajouté délicatement au sommet de la colonne. Le tableau 2 résume les volumes, la composition de l'éluant et le numéro de fraction des solvants utilisés pour effectuer la chromatographie.

Tableau 2 : Chromatographie de l'extrait dichlorométhane brut

Volume (ml)	Solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$	Volume Fraction	Numéro de fraction
1500	100 : 0	25 ml	1 - 60
6000	60 : 1	25 ml	60 - 300
1000	20 : 1	1000 ml	Flush 20 : 1
1000	0 : 100	1000 ml	Flush MeOH

Cette étape a été effectuée à deux reprises pour purifier les 18 g d'extrait dichlorométhane disponibles. Les fractions contenant des produits similaires par chromatographie sur couche mince ont été regroupées.

B) Chromatographie de l'extrait hexane du bois de pin gris

L'extrait à l'hexane a été partitionné par extraction liquide-liquide entre l'hexane et le méthanol aqueux (60 %). Cette partition avait pour but d'éliminer les acides résiniques présents en grande quantité dans l'extrait brut. La colonne a été montée comme précédemment avec 400 g de silice. La portion soluble dans le méthanol aqueux (6,5 g) a été déposée sur la tête d'une colonne de silice tel que décrit précédemment (9 cm x 14 cm). Le tableau 3 résume les volumes, la composition de l'éluant solvants utilisés pour effectuer la chromatographie et le numéro des fractions associées.

Tableau 3 : Chromatographie de l'extrait hexane du bois de pin gris

Volume (ml)	Solvant DCM-MeOH	Volume Fraction	Numéro de fraction
2000	100 : 0	230 ml	1 - 9
2000	100 : 1	230 ml	10 - 18
2000	80 : 1	230 ml	19- 27
2000	40 : 1	230 ml	27 - 36
1000	20 : 1	230 ml	37 - 41
1000	0 : 100	1000 ml	Flush MeOH

2.4.4 La chromatographie en phase gazeuse

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé dans ces travaux est celui des laboratoires d'enseignement du Département des Sciences Fondamentales (DSF). Il s'agit d'un appareil Agilent 6890N, couplé à un spectromètre de masse et d'un injecteur automatique de la série 7683. La méthode de chauffage, le débit des gaz ainsi que les différents paramètres sont

résumés au tableau 4. Les échantillons ont été dérivés à l'aide de diazométhane avant l'injection pour augmenter la volatilité des produits (acides).

Tableau 4 : Paramètre d'utilisation du GC/MS

Appareil: Modèle HP6890	Détection: MS quadrupole Ionisation : EI, 70 eV	Colonne: DB-5 Longueur: 30 m Diamètre: 0.25mm Size : 0.25µm
Conditions chromatographiques : Injection : 3µl Gaz porteur : Hélium, 1ml/min	Température : Injecteur : 250 °C Détecteur : 280 °C Colonne initiale : 100 °C (1 min) Colonne gradient : 3 °C/min Colonne finale : 280 °C	

2.4.5 La chromatographie liquide haute performance

Les travaux d'isolation ont nécessité deux types de chromatographes liquides haute performance (HPLC). Les sous-sections suivantes traitent plus précisément du HPLC analytique couplé à un détecteur MS ainsi que du HPLC à capacité semi-préparative.

A) HPLC analytique couplé à un détecteur MS

Le HPLC utilisé est un Agilent de la série 1100 équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un système d'injecteur automatique, d'un module chauffe-colonne, d'un détecteur UV-visible à barrette à diodes ainsi que d'un détecteur MS. Cet appareil permet d'évaluer la complexité d'une fraction, le niveau de pureté d'un produit, et donne également des informations structurales sur les produits séparés (profil de fragmentation et ion moléculaire). De plus, l'appareil a été utilisé pour élaborer une méthode de séparation sur HPLC préparatif.

Tableau 5 : Condition en HPLC analytique utilisé pour l'analyse de l'échantillon 1C

Appareil: Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : 1C Fichier : \Sirois\1C000008		Détection: UV (DAD) MSD		Colonne: ZORBAX ODS Longueur: 150mm Diamètre: 4.6mm Size : 5µm # série : USG0014484	
Conditions chromatographiques : Injection : 5µl Solvent A : H2O Solvent B : MeOH Élution: Isocratique 50% B Débit: 1mL/min Temp.colonn 25°C					
DAD: Long. d'onde 250		Bandwith 100		Référence : Long. d'onde 360 Bandwith 100	
Paramètre MSD :		Mode: scan Polarité: (+)		Mass Range: 100-1000 Fragmentor: 70	
Chambre : Drying gas flow (L/min): 10 Nebulizer pressure (psig): 40 Drying gas temp (°C): 350			Capillary voltage (V): 4000 Corona current (µA): 4 Vaporizer temp (°C): 400		

Tableau 6 : Condition en HPLC analytique utilisé pour l'analyse de l'échantillon CS6C

Appareil: Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : CS6C Fichier : \CSirois\66-C0009		Détection: UV (DAD) MSD		Colonne: ZORBAX ODS Longeur: 150mm Diamètre: 4.6mm Size : 5µm # série : USG0014484	
Conditions chromatographiques : Injection : 5µl Solvent A : H2O+0.1%HCOOH Solvent B : ACN+0.1%HCOOH			Élution : Isocratique 40% B Débit : 1mL/min Temp.colonne : 25°C		
DAD: Long. d'onde 250		Bandwith 100		Référence : Long. d'onde 360 100	
Paramètre MSD :		Mode: scan Polarité: (+)		Mass Range: 100-1000 Fragmentor: 70	
Chambre : Drying gas flow (L/min): 10 Nebulizer pressure (psig): 30 Drying gas temp (°C): 350			Capillary voltage (V): 4000 Corona current (µA): 4 Vaporizer temp (°C): 400		

Toutes les fractions furent analysées avec une méthode isocratique. Les tableau 5 et 6 résument les principaux paramètres de la méthode d'analyse.

B) HPLC à capacité semi-préparative

Ce type de HPLC permet la récupération du matériel après analyse. Le système semi-préparatif du laboratoire est un appareil Agilent de la série 1100. Il est pourvu de deux pompes binaires, d'un détecteur UV-visible et d'un collecteur de fractions. Les conditions de la fraction 1C apparaissent au tableau 7. La fraction 1E a été traitée dans les mêmes conditions. Cependant, le pourcentage de méthanol y a été ajusté à 40%. La fraction CS6C est soumise aux mêmes conditions d'élution décrite au tableau 6.

Tableau 7 : Conditions HPLC utilisées pour l'isolation des composés de la fraction 1C

Appareil: Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : 1C Concentration échantillon 100 mg/mL		Détection: UV (DAD)	Colonne: ZORBAX ODS Longueur: 25 cm Diamètre: 21.2 mm Size : 7 µm # série : USBY002127	
Conditions chromatographiques : Injection : 200 µL Solvent A : H ₂ O Solvent B : MeOH Élution : Isocratique 50% B Débit : 16 mL/min Temp.colonne : 25°C				
DAD: Long. d'onde	Bandwith	Référence :	Long. d'onde	Bandwith
250	100		360	100

2.5 LA SPECTROSCOPIE

Les techniques spectroscopiques sont généralement des méthodes servant à identifier les produits analysés.

2.5.1 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN) Bruker Avance 400 est employé à 298°K pour réaliser les spectres. La sonde QNP (5mm), capable de produire des gradients (Z) de champ magnétique est optimisée pour une fréquence de 400.13 MHz pour le proton et 100.61 MHz pour le carbone. Toutes les molécules font l'objet de plusieurs expériences : 1D ^1H , 1D ^{13}C , DEPT-135, COSY, HMBC et HSQC. Les échantillons de 5 à 10 mg sont solubilisés dans le méthanol- d_4 ou le chloroforme- d , selon leurs affinités. Les déplacements chimiques (ppm) ont été référencés avec les signaux du solvant résiduel, pour le chloroforme (proton 7,26 ppm, carbone 77,0 ppm) et pour le méthanol (proton 3,31 ppm et carbone 49,0 ppm).

CHAPITRE 3
RÉSULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1.1 Résultats des extractions de la première cueillette

Les extractions séquentielles des produits naturels du bois de *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. resinosa* et *Thuja occidentalis* ont été effectuées avec un Soxhlet contenant 50 g. Les rendements de ces extractions figurent au tableau 8.

Tableau 8 : Rendements obtenus avec l'approche séquentielle d'extraction pour les différents bois de la première cueillette

Espèces :	HEX		DCM		MeOH		H ₂ O	
	Rend. (%) ^b	Masse (g)	Rend. (%) ^b	Masse (g)	Rend. (%) ^b	Masse (g)	Rend. (%) ^b	Masse (g)
<i>T. occidentalis</i> ^a	1,9%	0,8	0,8%	0,4	3,9%	1,7	0,0	0,1
<i>P. banksiana</i> ^a	2,5%	1,1	1,1%	0,4	1,2%	0,5	0,4%	0,2
<i>P. resinosa</i> ^a	5,2%	2,1	0,3%	0,1	1,1%	0,5	0,4%	0,2
<i>P. strobus</i> ^a	6,9%	3,0	1,0%	0,5	2,2%	0,9	0,4%	0,2

^a environ 45 g de bois utilisé

$$^b \left(\frac{\text{masse d'extrait obtenue}}{\text{masse de bois utilisée}} \right) \times 100 \text{ Ex : } \left(\frac{0,82 \text{ g}}{43,9 \text{ g}} \right) \times 100 = 1,9 \%$$

Les rendements obtenus montrent des variations importantes entre les espèces. Ces résultats suggèrent que les bois des différents pins étudiés sont riches en composés peu polaires qui ont des affinités avec l'hexane. Le *Thuja occidentalis* semble cependant riche en composés polaires ayant une forte affinité pour le méthanol.

3.1.2 Résultats des extractions de la seconde cueillette

Rappelons que la seconde cueillette a eu lieu approximativement 1 an après la première.

Tableau 9 : Rendements des extractions de la seconde cueillette

Espèces :	HEX		DCM		MeOH		H ₂ O	
	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)
<i>T. occidentalis</i>	1,5%	1,4	0,5%	0,5	4,3%	4,0	0,8%	0,7
<i>P. banksiana</i>	2,2%	2,0	1,7%	1,6	2,0%	1,9	0,5%	0,4
<i>A. balsamea</i>	0,4%	0,4	0,5%	0,5	2,7%	2,5	0,9%	0,8
<i>P. tremuloïdes</i>	4,0%	1,7	0,6%	0,3	6,6%	2,8	1,8%	0,8
<i>B. alleghaniensis</i>	0,3%	0,4	0,2%	0,3	2,0%	2,8	0,5%	0,7
<i>B. papyrifera</i>	2,7%	1,1	1,3%	0,5	8,9%	3,8	2,1%	0,9
<i>P. mariana</i>	0,6%	0,5	0,2%	0,2	0,7%	0,6	0,8%	0,8
<i>P. glauca</i>	0,5%	0,4	0,3%	0,3	0,8%	0,8	1,2%	1,1

Tel que montré dans le tableau 9, les rendements obtenus pour certaines espèces sont étonnamment élevés. En combinant les quatre extraits, le *Populus tremuloïdes* et le *Betula papyrifera* affichent des rendements en extractibles de l'ordre de 13,0 % et 14,9 %. Ces rendements dépassent de beaucoup ceux obtenus avec le *Betula alleghaniensis*, *Picea mariana* et *P. glauca* qui n'atteignent même pas 3 % en extractibles.

3.1.3 Rendements des extractions avec la sonde à ultrason

L'utilisation des ultrasons visait à augmenter les rendements d'extractions des produits naturels du bois de pin gris ou à obtenir des résultats comparables dans des temps plus courts que l'extraction au Soxhlet. Deux extractions ont été réalisées; la première, séquentielle avec l'hexane et le dichlorométhane et la seconde, avec le dichlorométhane seulement. L'extraction séquentielle effectuée a permis d'obtenir des rendements de 1.2% avec l'hexane et de 2.1 % avec le dichlorométhane. Les extractions au Soxhlet ont donné des rendements supérieurs avec l'hexane mais inférieurs avec le dichlorométhane. L'extraction au dichlorométhane a permis d'obtenir un rendement de 2.9% ce qui se

compare avec l'addition des deux rendements séquentiels hexane et dichlorométhane (3,3%). L'utilisation des ultrasons, même si les résultats étaient encourageants, n'a pas été priorisé pour la suite de ce projet en raison de problème prévue de mise à l'échelle.

3.1.4 Rendements des extractions à grande échelle (Soxhlet 400 g)

Les rendements des extractions à grande échelle du bois interne de *Pinus banksiana* sont décevants par rapport aux tests préliminaires à petite échelle. À partir de 11 kg de bois, 150 g (1,4 %) d'extrait hexane et seulement 20 g (0,2 %) d'extrait dichlorométhane ont pu être récupérés. Ces faibles rendements sont, par contre, explicables. D'une part, à quelque reprise, le système de réfrigération a semblé défaillir au cours de l'expérience, ce qui a détruit des portions d'extrait. Par ailleurs, la taille des cartouches ne facilite pas le passage du solvant de façon uniforme dans la cartouche : des portions pourraient ne pas avoir été extraites durant le processus. Les rendements d'extraction observés à grande échelle sont nettement inférieurs à ceux observés à plus petite échelle. Ces problèmes amènent à mettre en doute la pertinence de cette technique pour l'extraction sur de grandes quantités de bois à un faible rendement. Aussi, dans les travaux futurs sur le bois de *Pinus banksiana*, il est suggéré d'utiliser d'autres méthodes comme par exemple, la lixiviation sur une colonne.

3.2 CRIBLAGE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

3.2.1 Résultats du criblage biologique de la première cueillette

Les résultats des extraits de première cueillette aux tests d'activité anticancéreuse constituent la raison d'être de ce projet. Ces résultats ont d'ailleurs servi à déterminer le

choix de l'espèce pour l'analyse phytochimique. L'analyse des résultats du tableau 10 indique clairement que certains extraits ne démontrent pas d'activité cytotoxique sur les cellules. Aucun des extraits aqueux ne présente d'activité digne de mention. Parmi les quatre espèces du tableau 10, les extraits au méthanol et certains au dichlorométhane montrent une certaine cytotoxicité. L'extrait au dichlorométhane du bois de *Thuja occidentalis* est fortement cytotoxique avec des IC_{50} souvent inférieurs à 10 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, cet extrait et même celui au méthanol semblent davantage cytotoxiques pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses. Il est intéressant de souligner que les extraits au méthanol et au dichlorométhane du *Pinus banksiana* et du *Pinus resinosa*, bien que moins cytotoxiques que les extraits de *Thuja occidentalis*, montrent une toxicité plus sélective aux cellules cancéreuses. Pour cette raison et parce que le rendement d'extraction au dichlorométhane est plus concluant, nous avons porté notre attention sur le pin gris.

3.2.1 Résultats du criblage biologique de la seconde cueillette

Le tableau 11 présente tous les IC_{50} des tests anticancéreux de la deuxième cueillette. Les résultats avec le *Thuja occidentalis* et le *Pinus banksiana* diffèrent de la première cueillette. Dans le cas du *Thuja*, l'extrait à l'hexane de la seconde cueillette (IC_{50} A-549 = 11 ± 1) semble beaucoup plus actif que celui de la première cueillette (IC_{50} A-549 = 111 ± 8). L'extrait dichlorométhane apparaît par contre un peu moins actif. Cette tendance s'observe aussi chez *Pinus banksiana* où l'extrait à l'hexane se montre légèrement plus actif et l'extrait au dichlorométhane légèrement moins, dans les extraits de la seconde cueillette.

Tableau 10 : Résultats IC₅₀ des tests d'activité anticancéreuse de la première cueillette

Espèce	Solvant	Hoechst (µg/mL)		
		A-549	DLD-1	WS1
<i>T. occidentalis</i>	Hex.	30±2	23±2	21±3
<i>T. occidentalis</i>	DCM	6±1	3±1	4±1
<i>T. occidentalis</i>	MeOH	28±1	15±1	16±2
<i>T. occidentalis</i>	H ₂ O	nd	nd	nd
<i>P. banksiana</i>	Hex.	58±4	68±5	121±6
<i>P. banksiana</i>	DCM	28±2	29±3	75±7
<i>P. banksiana</i>	MeOH	20±2	36±3	46±4
<i>P. banksiana</i>	H ₂ O	>200	94±10	108±11
<i>P. resinosa</i>	Hex.	193±16	>200	>200
<i>P. resinosa</i>	DCM	50±7	51±3	103±11
<i>P. resinosa</i>	MeOH	56±5	51±3	69±7
<i>P. resinosa</i>	H ₂ O	>200	170±10	151±13
<i>P. strobus</i>	Hex.	55±4	65±4	138±6
<i>P. strobus</i>	DCM	21±1	19±2	42±5
<i>P. strobus</i>	MeOH	>200	>200	>200
<i>P. strobus</i>	H ₂ O	>200	129±9	142±13

Note : Témoin positif : Etoposide : A-549 1,0 ± 0.3, DLD-1 : 4±1 et WS1 : nd

Le tableau 11 démontre que les extraits aqueux sont inactifs sur les cellules. Dans les six nouvelles espèces testées, seul l'extrait hexane de *Picea mariana* montre une certaine sélectivité sur les cellules cancéreuses comparable aux extraits hexane et dichlorométhane du bois de *Pinus banksiana*. Les résultats de l'évaluation de l'activité anticancéreuse des matrices végétales de cette récolte confirment que le bois de *Pinus banksiana* possède une activité intéressante et suggèrent qu'il contient un ou des composés potentiellement anticancéreux.

Tableau 11 : Résultats IC₅₀ des tests d'activité anticancéreuse de la deuxième cueillette

Espèce	Solvant	Hoechst (µg/mL)		
		A-549	DLD-1	WS-1
<i>T. occidentalis</i>	Hex.	11 ± 1	6 ± 1	8 ± 1
<i>T. occidentalis</i>	DCM	16 ± 1	15 ± 2	19 ± 3
<i>T. occidentalis</i>	MeOH	20 ± 2	11 ± 1	38 ± 8
<i>T. occidentalis</i>	H ₂ O	> 200	123 ± 10	154 ± 26
<i>P. banksiana</i>	Hex.	30 ± 2	53 ± 6	103 ± 2
<i>P. banksiana</i>	DCM	23 ± 2	64 ± 6	119 ± 15
<i>P. banksiana</i>	MeOH	29 ± 2	44 ± 4	60 ± 9
<i>P. banksiana</i>	H ₂ O	> 200	198 ± 20	> 200
<i>A. balsamea</i>	Hex.	178 ± 24	> 200	> 200
<i>A. balsamea</i>	DCM	45 ± 4	46 ± 4	59 ± 3
<i>A. balsamea</i>	MeOH	113 ± 7	112 ± 13	105 ± 8
<i>A. balsamea</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200
<i>P. tremuloides</i>	Hex.	137 ± 7	126 ± 4	163 ± 21
<i>P. tremuloides</i>	DCM	76 ± 6	47 ± 2	63 ± 6
<i>P. tremuloides</i>	MeOH	82 ± 5	64 ± 4	50 ± 5
<i>P. tremuloides</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200
<i>B. alleghaniensis</i>	Hex.	77 ± 4	73 ± 5	75 ± 8
<i>B. alleghaniensis</i>	DCM	63 ± 4	44 ± 3	52 ± 7
<i>B. alleghaniensis</i>	MeOH	> 200	200 ± 14	> 200
<i>B. alleghaniensis</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200
<i>B. papyrifera</i>	Hex.	67 ± 7	59 ± 5	25 ± 2
<i>B. papyrifera</i>	DCM	61 ± 4	50 ± 3	33 ± 4
<i>B. papyrifera</i>	MeOH	151 ± 7	137 ± 8	173 ± 19
<i>B. papyrifera</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200
<i>P. mariana</i>	Hex.	63 ± 3	88 ± 5	111 ± 7
<i>P. mariana</i>	DCM	57 ± 4	50 ± 3	53 ± 6
<i>P. mariana</i>	MeOH	110 ± 5	67 ± 4	56 ± 4
<i>P. mariana</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200
<i>P. glauca</i>	Hex.	49 ± 4	55 ± 5	30 ± 8
<i>P. glauca</i>	DCM	67 ± 5	60 ± 3	37 ± 4
<i>P. glauca</i>	MeOH	151 ± 7	53 ± 3	59 ± 4
<i>P. glauca</i>	H ₂ O	> 200	> 200	> 200

Note : Témoin positif : Etoposide : A-549 1,0 ± 0,3, DLD-1 : 4±1 et WS1 : nd

Les tests ORAC permettent d'évaluer le capacité antioxydant des différents extraits.

Une valeur de 1 µM/mg signifie que 1 µM de trolox sont nécessaire pour produire la même activité antioxydante que 1 mg d'extrait. Les résultats obtenus pour les espèces de seconde cueillette sont présentés au tableau 12. La majorité des espèces testées montrent une activité

antioxydante intéressant. Les extraits à l'hexane, à l'exception de ceux du *T. occidentalis*, *B. alleghaniensis* et *P. banksiana*, s'avèrent moins actifs que les autres extraits obtenus avec des solvants plus polaires. Les résultats les plus intéressants sont obtenus avec les extraits méthanoliques de *Thuja occidentalis*, *Pinus banksiana*, *Abies balsamea*, *Populus tremuloïdes*, *Betula papyrifera* et *Picea glauca*. L'extrait au dichlorométhane d'*Abies balsamea* montre une excellente réponse aux tests ORAC. De plus, des tests sur cellules ont été effectués avec les extraits afin d'évaluer l'activité antioxydante dans un contexte cellulaire. Les résultats obtenus sur modèle cellulaire indiquent qu'aucun des extraits à l'hexane et au dichlorométhane ne possède un pouvoir antioxydant. Les extraits aqueux et méthanoliques possèdent en revanche des niveaux d'activité élevée pour les espèces suivantes : *Abies balsamea*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera*, et seulement l'extrait méthanolique du *Populus tremuloïdes*, *Picea glauca* et *Picea mariana*. Tous les IC₅₀ de ces extraits sont inférieurs à 4 µg/ml (la concentration minimale testée), ce qui est étonnant.

Les résultats sur l'activité antibactérienne des extraits de la seconde cueillette sont regroupés au tableau 13. Selon les résultats obtenus, les extraits de *Thuja* se démarquent par leur efficacité. Il semble qu'ils soient à la fois actifs sur les bactéries à gram positif et négatif. L'extrait méthanolique du *Pinus banksiana* montre encore une activité très marquée à la fois sur les grams positifs et négatifs.

Tableau 12 : Résultats des indices ORAC et activité antioxydante sur cellule pour les extraits de la seconde cueillette

Espèce	Solvant	Indice ORAC	Antiox Cellules
		$\mu\text{Mol Trolox / mg}$	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$
<i>T. occidentalis</i>	Hex.	$4,7 \pm 0,8$	nd
<i>T. occidentalis</i>	DCM	$4,7 \pm 0,3$	nd
<i>T. occidentalis</i>	MeOH	$8,7 \pm 0,7$	nd
<i>T. occidentalis</i>	H ₂ O	$4,5 \pm 0,3$	nd
<i>P. banksiana</i>	Hex.	$1,5 \pm 0,4$	nd
<i>P. banksiana</i>	DCM	4 ± 1	nd
<i>P. banksiana</i>	MeOH	17 ± 2	nd
<i>P. banksiana</i>	H ₂ O	$3,1 \pm 0,5$	nd
<i>A. balsamea</i>	Hex.	$0,7 \pm 0,2$	nd
<i>A. balsamea</i>	DCM	15 ± 2	$<0,4$
<i>A. balsamea</i>	MeOH	$9,6 \pm 0,7$	3 ± 1
<i>A. balsamea</i>	H ₂ O	$1,9 \pm 0,3$	8 ± 2
<i>P. tremuloides</i>	Hex.	$0,11 \pm 0,04$	nd
<i>P. tremuloides</i>	DCM	$1,2 \pm 0,3$	43 ± 13
<i>P. tremuloides</i>	MeOH	$6,5 \pm 0,6$	3 ± 1
<i>P. tremuloides</i>	H ₂ O	$0,8 \pm 0,1$	15 ± 4
<i>B. alleghaniensis</i>	Hex.	$1,6 \pm 0,3$	nd
<i>B. alleghaniensis</i>	DCM	$3,0 \pm 0,7$	58 ± 13
<i>B. alleghaniensis</i>	MeOH	$0,6 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,5$
<i>B. alleghaniensis</i>	H ₂ O	4 ± 1	$0,9 \pm 0,1$
<i>B. papyrifera</i>	Hex.	$0,045 \pm 0,006$	nd
<i>B. papyrifera</i>	DCM	$2,7 \pm 0,7$	24 ± 6
<i>B. papyrifera</i>	MeOH	13 ± 1	$0,94 \pm 0,09$
<i>B. papyrifera</i>	H ₂ O	$4,0 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$
<i>P. mariana</i>	Hex.	$0,10 \pm 0,04$	194 ± 35
<i>P. mariana</i>	DCM	$1,71 \pm 0,04$	12 ± 5
<i>P. mariana</i>	MeOH	5 ± 1	$1,27 \pm 0,05$
<i>P. mariana</i>	H ₂ O	$0,5 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,2$
<i>P. glauca</i>	Hex.	$0,051 \pm 0,005$	153 ± 42
<i>P. glauca</i>	DCM	$1,4 \pm 0,1$	18 ± 3
<i>P. glauca</i>	MeOH	9 ± 1	$1,2 \pm 0,7$
<i>P. glauca</i>	H ₂ O	$0,21 \pm 0,03$	319 ± 67

Tableau 13 : Évaluation de l'activité antibiotique de plusieurs espèces de la forêt boréale

Résultats des tests antibactériens d'extraits de la seconde cueillette

Espèce	Solvant	IC ₅₀ (µg/mL)	
		E.coli	S.aureus
<i>T. occidentalis</i>	Hex.	6,8 ± 0,7	40 ± 5
<i>T. occidentalis</i>	DCM	96 ± 15	126 ± 50
<i>T. occidentalis</i>	MeOH	34 ± 3	77 ± 6
<i>T. occidentalis</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>P. banksiana</i>	Hex.	> 160	58 ± 15
<i>P. banksiana</i>	DCM	> 160	150 ± 25
<i>P. banksiana</i>	MeOH	111 ± 9	50 ± 1
<i>P. banksiana</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>A. balsamea</i>	Hex.	> 160	134 ± 15
<i>A. balsamea</i>	DCM	> 160	134 ± 7
<i>A. balsamea</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>A. balsamea</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>P. tremuloides</i>	Hex.	> 160	79 ± 19
<i>P. tremuloides</i>	DCM	> 160	85 ± 4
<i>P. tremuloides</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>P. tremuloides</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>B. alleghaniensis</i>	Hex.	> 160	103 ± 22
<i>B. alleghaniensis</i>	DCM	> 160	75 ± 10
<i>B. alleghaniensis</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>B. alleghaniensis</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>B. papyrifera</i>	Hex.	> 160	124 ± 13
<i>B. papyrifera</i>	DCM	> 160	61 ± 2
<i>B. papyrifera</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>B. papyrifera</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>P. mariana</i>	Hex.	> 160	67 ± 4
<i>P. mariana</i>	DCM	> 160	184 ± 20
<i>P. mariana</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>P. mariana</i>	H ₂ O	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	Hex.	> 160	59 ± 2
<i>P. glauca</i>	DCM	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	MeOH	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	H ₂ O	> 160	> 160

Note : Témoin positif : Chloramphénicol : *S. aureus* : 7 ± 1 et *E. coli* : 0.90 ± 0.06

3.3 CHOIX DE L'ESPÈCE

Les résultats de la première cueillette ont confirmé le potentiel anticancéreux de deux espèces, le *Pinus banksiana* et le *Pinus resinosa*. Ces extraits montraient une activité sélective sur les cellules cancéreuses. Le choix final de l'espèce s'est fait en considérant les rendements d'extraction du *Pinus banksiana*, qui sont supérieurs à ceux obtenus avec le *Pinus resinosa*. Les résultats obtenus lors de la seconde cueillette n'ont pas été pris en compte puisqu'elle a été effectuée un an après le début du projet. Malgré cela, les résultats découlant de la seconde cueillette ne remettent pas en question la pertinence du choix de *Pinus banksiana*.

3.4 RÉSULTATS DE CHROMATOGRAPHIE

Les travaux de chromatographie ont conduit à l'isolation de neuf molécules. Les six premières molécules viennent de l'extrait dichlorométhane. Les trois autres sont issues de l'extrait hexane.

3.4.1 Isolation des composés de l'extrait dichlorométhane

La première chromatographie effectuée avec 10 g d'extrait, telle que décrite à la section 2.4.3 a permis d'obtenir plusieurs fractions dont les fractions 1B (1,90 g), 1C (1,74 g) et 1E (0,66 g) particulièrement intéressantes pour un fractionnement subséquent car elles présentent un rendement élevé et une composition chimique simple (par CCM). La

figure 9 résume le travail de purification effectué sur l'extrait dichlorométhane.

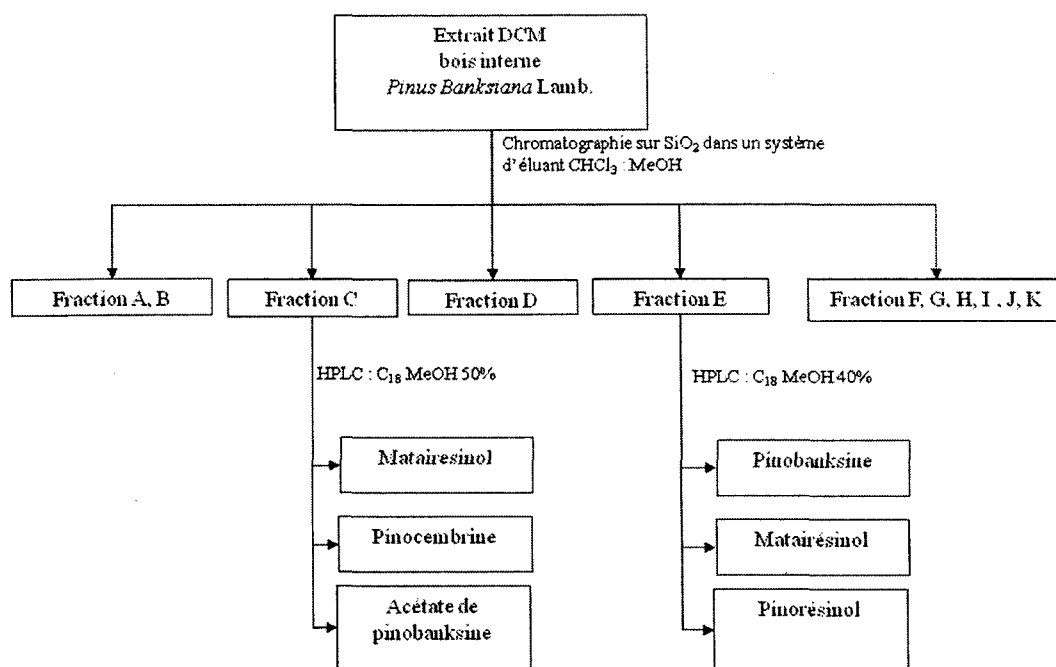


Figure 9 : Schéma de purification de l'extrait au dichlorométhane

Les analyses par CCM de la fraction 1B (figure 10), montrent la présence de trois taches dans la même zone chromatographique. Plusieurs conditions d'élution ont été mises à l'essai et aucune n'a permis d'obtenir une meilleure séparation. Il est intéressant de souligner que l'une des taches de cette fraction semble correspondre à la tache majoritaire de la fraction 1C.

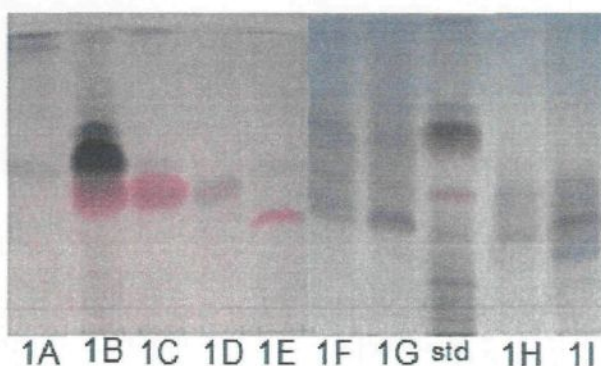


Figure 10 : Chromatographie sur couche mince sur gel de silice des fractions 1A à 1I

(CHCl₃ : MeOH 40 : 1; vanilline)

La figure 11, illustrant le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse de la fraction 1B, montre clairement la présence de deux produits majoritaires et d'un produit minoritaire. Par comparaison avec les données de la banque spectrales NIST02 et de standards du laboratoire, les deux molécules majoritaires ont pu être identifiées comme étant la pinocembrine ($m/z = 256$ g/mol, $T_R = 41,5$ min) et le pinosylvine monométhyle ether ($m/z = 226$ g/mol, $T_R = 46,5$ min). Il n'a pas été possible d'identifier le produit responsable du pic visible à 34 minutes (Figure 11). Cette fraction semble contenir les constituants majoritaires du bois de *Pinus banksiana* car elle représente 30% de la masse de l'extrait au dichlorométhane.

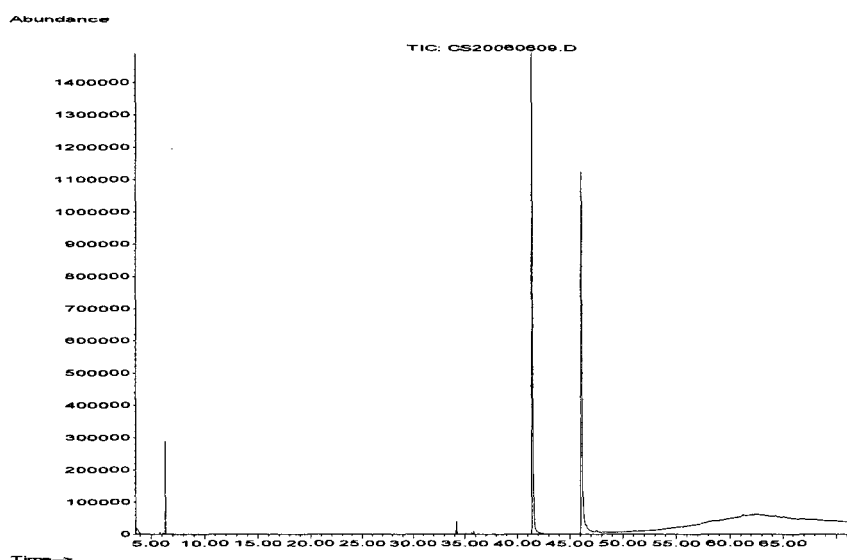


Figure 11 : Chromatogramme GC/MS de la fraction 1B

La CCM de la fraction 1C (figure 10), montre la présence d'un composé majoritaire et d'un produit minoritaire. L'analyse par HPLC en utilisant des conditions isocratiques (50% MeOH / H₂O) révèle clairement la présence de trois produits dont un majoritaire.

Le spectromètre de masse couplé au HPLC a permis de déduire que le produit majoritaire ($T_R = 50$ min) possède une masse molaire de 256 g/mol, tandis que les produits élués à 10 min et 56 min ont des masses molaires de 358 g/mol 314 g/mol respectivement. Lorsque cette méthode a été transposée avec succès sur HPLC préparatif (figure 12), la récolte des fractions et leurs combinaisons ont conduit à trois produits purs : CS1CA (15,6 mg), CS1CB (54,2 mg) et CS1CC (6,2 mg). Ces quantités ont été obtenues de cinq injections, ce qui correspond à 100 mg de la fraction 1C.

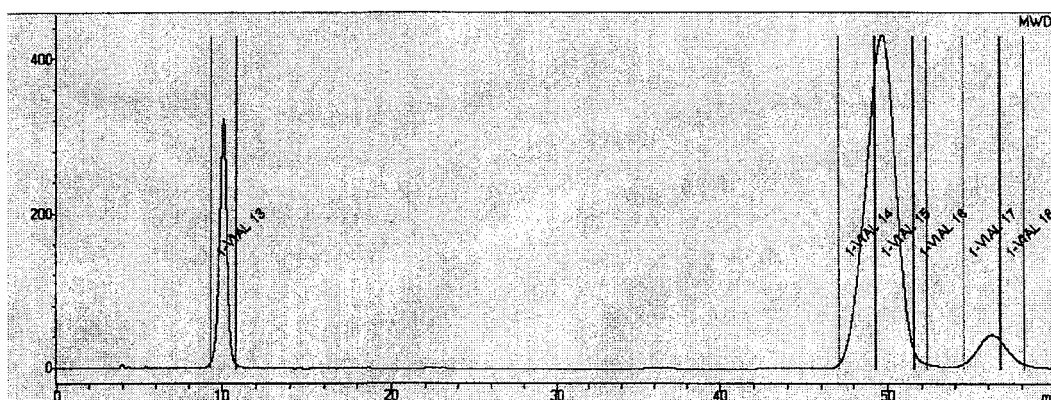


Figure 12 : Chromatogramme HPLC préparatif de la fraction 1C

Afin de disposer de plus de matériel, la masse de la fraction 1E a été augmentée en la combinant avec une fraction similaire provenant d'une autre chromatographie. L'analyse par CCM montre, après révélation à la vanilline, la présence d'un produit majoritaire. Ce produit majoritaire est cependant accompagné d'une impureté visible par CCM et l'analyse HPLC en condition isocratiques (40 % MeOH : H₂O) révèle la présence de trois produits. La purification par HPLC semi-préparatif à partir de 180 mg de la fraction 1E (figure 13a) conduit à l'isolation de 3,0 mg de CS1EA, 1 mg CS1EB et 38 mg du produit majoritaire CS1EC.

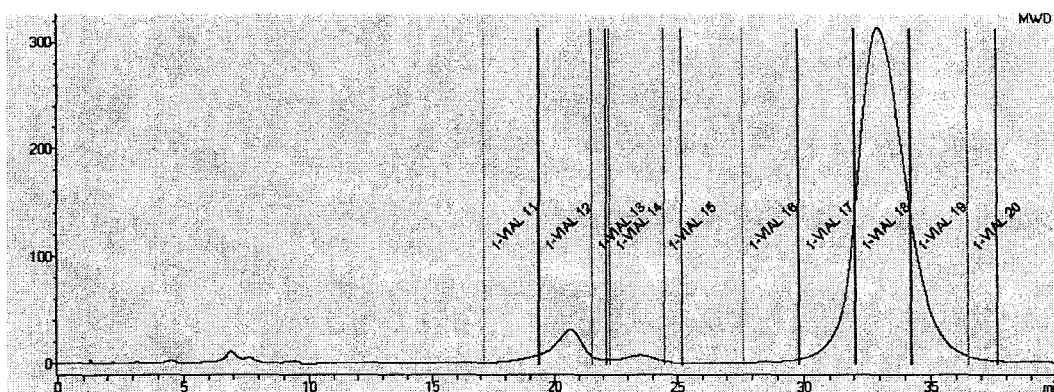


Figure 13 : Chromatogramme HPLC de la fraction 1E

3.4.2 Purification de l'extrait à l'hexane

Les rendements d'extraction obtenus sur le bois de *Pinus banksiana* avec l'hexane sont supérieurs à ceux obtenus avec le dichlorométhane. Il a donc été possible de disposer d'une quantité suffisante de cet extrait pour entreprendre un fractionnement guidé par la bioactivité. La figure 14 présente le schéma d'isolation des différentes molécules de l'extrait hexane.

Comme différents groupes l'ont décrit [Rudloff, 1965; Bower, 1969; Rowe, 1971], les différentes parties du pin gris contiennent des acides diterpéniques nommés acides résiniques. Ces acides puisqu'ils sont solubles dans l'hexane ont été extraits selon nos conditions d'extraction. Il est possible de séparer les composés non polaires (acides résiniques et autres) des plus polaires avec une partition à l'hexane et une solution 60% MeOH/H₂O. Lorsque les deux phases sont soumises aux tests de bioactivité, la fraction MeOH 60% est plus active que l'extrait brut et la fraction hexane s'avère totalement inactive. Le fractionnement par chromatographie sur colonne sur gel de silice de la phase

méthanolique en utilisant un gradient d'élution CHCl_3 : MeOH (100 :0 à 20 :1) a conduit à la récupération de plusieurs fractions. L'activité cytotoxique de ces fractions a été évaluée sur les trois lignées cellulaires tel que présenté au tableau 14.

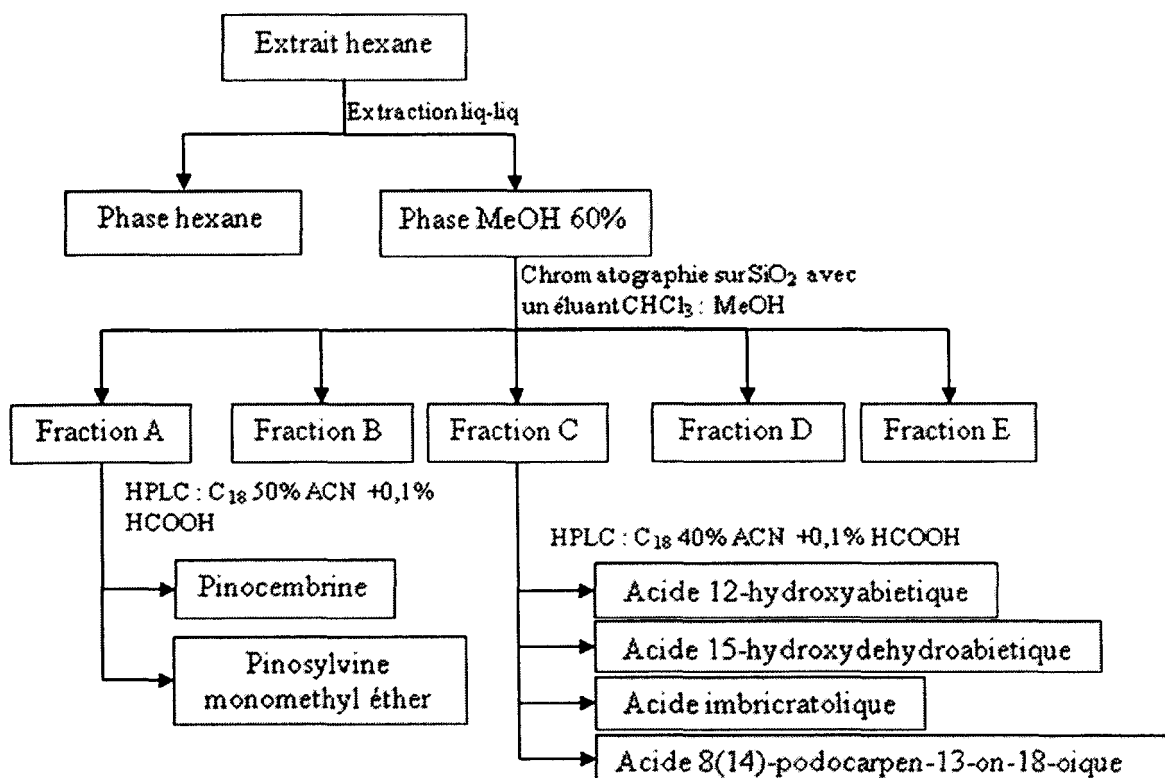


Figure 14 : Schéma de purification de l'extrait à l'hexane

Tableau 14 : Masse et valeur d'IC₅₀ de l'extrait à l'hexane et des différentes fractions obtenues lors de la purification primaire

Fraction	Masse totale	Hoechst (µg/mL)		
		A-549	DLD-1	WS-1
Extrait brut	50,0 g	97 ± 6	> 200	131 ± 6
Phase hexane	43,1 g	> 200	> 200	> 200
Phase MeOH 60%	6,9 g	34 ± 2	60 ± 11	48 ± 4
Fraction A	2,97 g	17 ± 1	35 ± 2	59 ± 8
Fraction B	0,35 g	32 ± 2	66 ± 5	94 ± 4
Fraction C	1,43 g	60 ± 3	79 ± 12	172 ± 28
Fraction D	0,56 g	38 ± 3	61 ± 8	132 ± 7
Fraction E	0,53 g	54 ± 3	53 ± 4	61 ± 7

La fraction A, qui présente une plus forte activité anticancéreuse a été purifiée par HPLC et ces travaux ont mené à l'isolement du pinocembrine et du pinosylvine monométhyle éther isolés par HPLC.

La fraction C est également intéressante puisqu'elle est abondante et sélective envers les cellules cancéreuses selon le test de Hoechst. Cette fraction est cependant très difficile à séparer par CCM dans des éluants constitués de chloroforme et de méthanol. La fraction a donc été analysée au HPLC analytique afin de déterminer son degré de complexité. Pour augmenter la résolution des pics, l'acide formique a été utilisé avec l'acétonitrile et l'eau. Puisque la séparation était satisfaisante (figure 15), la technique a été transposée sur HPLC préparatif et les fractions ont été récoltées selon la méthode décrite au tableau 6.

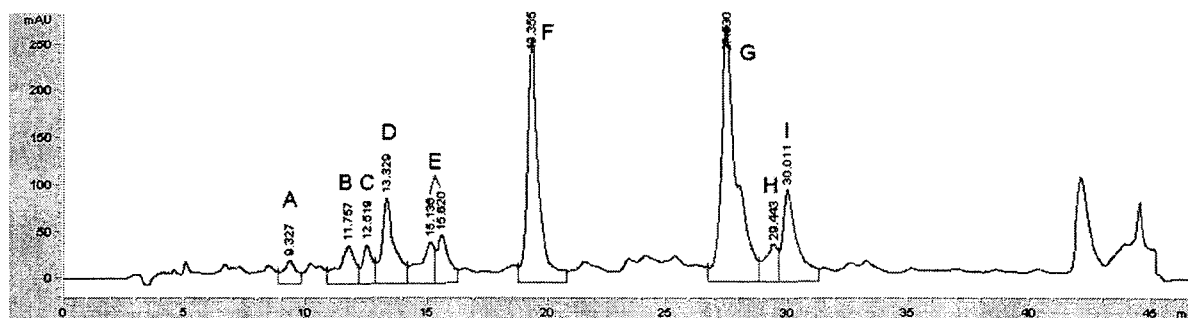


Figure 15 : Chromatogramme HPLC de la fraction CS6C

En 10 injections d'une masse totalisant 200 mg, il a été possible de récolter les fractions suivantes : CS6CA (9,3 min, 4 mg), CS6CB (11,7 min, trace), CS6CC (12,5 min, 9 mg), CS6CD (13,3 min, 8 mg), CS6CE (15,1 et 15,6 min, 17 mg), CS6CF (19,5 min, 12 mg), CS6CG (27,6 min, 100 mg), CS6CH (29,44 min, 17 mg) et CS6CI (30,0 min, 9 mg). La pureté de chaque fraction a été vérifiée par HPLC analytique : seuls C, D, F et H semblent purs.

3.5 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE : IDENTIFICATION DES MOLÉCULES

3.5.1 CS1CA et CS1EB : le matairésinol

Cette molécule a été isolée avec un rendement de 2,7 % par rapport à la masse de l'extrait au dichlorométhane. Le spectre RMN montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique trisubstitué en para et en méta. Les signaux à 4,17 et 3,94 ppm proviennent de protons attachés au même carbone (HSQC) qui est un CH₂ ($\delta_C = 72,9$) très déblindé, caractéristique d'un carbone oxygéné près d'une lactone. Les deux singulets 3,79 et 3,80 ppm, intégrant chacun pour 3H sont caractéristiques des groupes méthoxy. La structure de la molécule, son assignation totale et d'autres données sont indiquées en annexe et

concordent avec les données spectrales de la littérature [Umezawa, 1991]. Il s'agit, à notre connaissance, de la première mention du matairésinol dans le bois de pin gris. Les détails de l'identification sont fournis en annexe. Cette molécule a été isolée dans deux fractions soit CS1CA et CS1EB.

3.5.2 CS1BB : la pinosylvine monométhyle éther

La molécule CS1BB a été identifiée par CCM en la comparant la fraction 1B avec un standard de pinosylvine monométhyle éther en utilisant un milieu d'élution CHCl_3 : MeOH (40 :1). Puisque la molécule avait déjà été isolée du *Pinus banksiana* [Erdtman, 1943], la similitude entre le R_f (0.61) et la couleur de la tache permettent d'affirmer qu'il s'agit probablement de cette molécule. La confirmation s'est faite par injections sur GC/MS de l'échantillon et d'un standard de pinosylvine monométhyle éther. Les spectres de masse ainsi que les temps de rétention étaient identiques.

3.5.3 CS1CB : la pinocembrine

Ce composé a été obtenu avec un rendement d'isolation de 9,32% par rapport à la masse de l'extrait au dichlorométhane. Il est l'un des produits les plus abondants dans le bois de *Pinus banksiana*. Cette quantité aurait pu être fortement augmentée puisque la fraction 1B est, elle aussi, très riche en cette molécule. Le spectre RMN ^1H indique clairement la présence de deux noyaux aromatiques, l'un monosubstitué et le second tétrasubstitué, puisque l'intégration des signaux indique respectivement 5H et 2H. La multiplicité des signaux du noyau aromatique tétrasubstitué (d, $J = 2,2$ Hz) indique que les deux protons sont en position méta, l'un par rapport à l'autre. Un seul CH_2 est visible sur le spectre

DEPT-135. Les deux protons diastéréotopiques sont visibles sur le spectre proton. L'analyse attentive des spectres permet d'établir que ce composé est le pinocembrine. Ce composé phénolique a été déjà identifié par le groupe d'Erdtman [Erdtman, 1943]. Les détails de l'identification apparaissent en annexe et l'identification est confirmée par comparaison avec la littérature [Wagner, 1976].

3.5.4 CS1CC : l'acétate de pinobanksine

Cette molécule se retrouve en petite quantité dans l'extrait dichlorométhane du bois de pin gris (1%). Les spectres RMN de cette molécule montrent quelques similitudes (zone des aromatiques) avec les spectres de la pinocembrine. La présence en RMN ^{13}C d'un signal supplémentaire attribuable à une fonction carbonyle (δ_{C} 169,0) (caractéristique d'une fonction acétate) et la perte en RMN ^1H d'un proton diastéréotopiques et la présence d'un doublet à (δ_{H} 5.85; $J = 11,7$ Hz), permettent de déduire la structure de l'acétate de pinobanksine. La comparaison de nos résultats spectroscopiques avec les données spectrales de la littérature [Neacsu, 2007] permet de confirmer cette identification. Une analyse détaillée est présentée en annexe.

3.5.5 CS1EA : le pinorésinol

Cette molécule a été isolée en très faible quantité dans l'extrait (0,11%). Sur le spectre du proton, on dénote la présence d'un cycle benzénique avec trois protons. La multiplicité des signaux indique un profil de substitution en 1,3,4. Un seul CH_2 est détecté par le DEPT-135. L'analyse des spectres porte à croire qu'il s'agit de l'époxyconiferyl alcohol [Kostova, 1995]. Malheureusement, selon le spectre de masse, la masse moléculaire est de 358 g/mol,

un peu moins de deux fois celle de l'époxyconiferyl alcohol (196 g/mol). La consultation d'un erratum [Kostova, 2000] qui indique qu'il s'agit plutôt du pinorésinol et d'un article [Nathan, 2000] qui porte sur différents dérivés époxydés du trans-coniferyl alcohol ont cependant modifié notre vision l'identité de ce produit. Il apparaît hautement probable que le produit CS1EA possède un centre de symétrie qui cause certaine complication pour l'élucidation de sa structure. De plus, une analyse attentive du spectre RMN ^1H ne permet pas d'observer les constantes de couplage typique (12 à 13 Hz) des protons en position vicinale des fonctions époxydes [Nathan, 2000]. Les constantes de couplage observé pour les protons au voisinage des oxygènes ne dépassent pas 9 Hz. L'ensemble de ces informations permet de penser qu'il s'agit du pinorésinol. Cette molécule n'a jamais été rapportée auparavant dans le pin gris. Elle devrait aussi se retrouver dans un vaste éventail de plantes car elle est un précurseur de la lignine [Whetten, 1998]. Les détails de l'identification sont présentés en annexe.

3.5.6 CS1EC : la pinobanksine

Cette molécule a été obtenue avec un rendement d'isolation de 1,4% par rapport à la masse de l'extrait au dichlorométhane. Les signaux RMN ^1H associés aux protons aromatiques sont pratiquement identiques à ceux du pinocembrine (section 3.5.3). Aucun CH_2 n'est visible sur le DEPT-135, ce qui indique que la position 3 est substituée. La masse molaire déterminée par HPLC/MS (314 g/mol) ainsi que le déplacement chimique du proton en position 3 (δ_{H} 4,56 ppm) (plus déblindé que les protons diastéréotopiques de la pinocembrine mais moins déblindé que le proton en position 3 de l'acétate de

pinobanksine) permettent de penser qu'il s'agit de la pinobanksine. Cette molécule a déjà été rapportée dans le bois de pin gris [Erdtman, 1943]. Les détails de l'identification sont donnés en annexe et concordent avec les données de la littérature [Neacsu, 2007] .

3.5.7 CS6CC : l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique

Ce composé a été obtenu avec un rendement de 0,22% par rapport à la masse de l'extrait à l'hexane. Le spectre de masse couplé au HPLC permet d'observer l'ion moléculaire qui permet de déduire une masse molaire de 316 g/mol. Le spectre RMN C^{13} révèle la présence de 20 carbones, ce qui appuie l'hypothèse que ce produit est un diterpène. Des signaux entre 7,20 et 7,30 ppm sur le spectre proton confirment la présence d'un cycle aromatique. Cette dernière information permet de supposer que ce produit est apparenté à l'acide déhydroabiétique. Puisque l'acide déhydroabiétique non substitué présente une masse de 300 g/mol, cette molécule est fort probablement substituée par un oxygène. Le singulet à δ_H 1,60 d'une intégration de 6H indique que la fonction alcool est en position 15. En effet, sur l'acide déhydroabiétique, ce signal est un doublet puisque le proton, normalement présent en 15, dédouble le signal des méthyles. Il s'agit, à notre connaissance, de la première mention de l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique dans le *Pinus banksiana*. Les détails de son identification sont donnés en annexe.

3.5.8 CS6CD : l'acides 13-keto-8(14)-podocarpenoïque

Ce composé a été obtenu avec un rendement d'isolation de 0,11 % par rapport à l'extrait à l'hexane. Le rapport m/z de son ion moléculaire permet de déduire que sa masse molaire est de 276 g/mol. Le spectre RMN ^{13}C présente de façon évidente 17 signaux dont deux sont

attribués à des fonctions carbonyles de type cétone (200,1 ppm) et acide (184,3 ppm). De plus, les signaux à 126,4 et 165,1 ppm suggèrent la présence d'une double liaison conjuguée avec une fonction carbonyle. L'analyse détaillée des autres signaux RMN, ainsi qu'une comparaison des données avec celles de la littérature [Ikeda, 1977], ont permis d'identifier l'acide 13-keto-8(14)-podocarpenoïque. D'autres auteurs ont déjà isolé cette molécule dans le *Pinus banksiana* [Ikeda, 1977; Schuh, 1984] ainsi que dans d'autres espèces du genre *Pinus* [Cheung, 1993]. Les détails de l'identification sont donnés en annexe.

3.5.9 CS6CF : l'acide 12-hydroxyabiétique

L'acide 12-hydroxyabiétique a été obtenu avec un rendement d'isolation de 0,17% par rapport à la masse de l'extrait hexane du bois de pin gris. Sur le chromatogramme HPLC de la fraction CS6C, cette molécule semble être le produit majoritaire; toutefois, après évaporation, la masse indique qu'il se retrouve dans les mêmes proportions que les autres acides résiniques isolés. Le spectre du RMN ^1H présente trois signaux déblindés, soit deux triplets à 4,25 et 5,51 ppm et un singulet à 5,85 ppm. Grâce au spectre HSQC, les déplacements chimiques ^{13}C associés à ces protons ont été déterminés, permettant ainsi de les attribuer à deux fonctions alcéniques (5,51 ppm et 5,85 ppm) et à une fonction alcool (4,25 ppm). De plus, la présence d'une fonction acide est évidente sur le spectre RMN ^{13}C (181,0 ppm). On trouvera en annexe les détails de l'identification qui concorde avec les données spectrales fournies dans la littérature [Herz, 1965]. Cette molécule tend à

s'isomériser. En effet, quelques mois après son isolation, le vial ne contient plus que de l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique.

3.5.10 CS₆CH : l'acide imbricatolique

L'acide imbricatolique a été obtenu avec un rendement d'isolation de 0,22% par rapport à la masse de l'extrait hexane du bois de pin gris. Par HPLC/MS, le rapport m/z de son ion moléculaire permet de déduire que sa masse est de 322 g/mol. Le spectre RMN du carbone montre la présence de 20 carbones, ce qui peut laisser croire qu'il s'agit encore ici d'un acide résinique. La fonction carbonyle à 182,2 ppm confirme la présence de l'acide carboxylique. Dix CH₂ sont visibles sur le DEPT-135, ce qui infirme la possibilité d'un acide résinique tricyclique qui possède au maximum 9 CH₂ lorsqu'il n'y a aucune insaturation. Trois signaux se démarquent des autres dans l'analyse du spectre proton. Le signal à δ_H 4,53 et celui à δ_H 4,86 sont liés à un seul carbone, qui est un alcène géminale. Le signal à δ_H 3,71 correspond aux protons C-15 où est attaché un alcool. Les détails de l'identification se retrouvent en annexe et correspondent à ceux parus dans la littérature [Su, 1994].

3.6 BIOACTIVITÉ DES MOLÉCULES ISOLÉES

Les molécules isolées n'ont malheureusement pas toutes été testées. En effet, certaines molécules ont été isolées en trop petite quantité ou se sont dénaturées durant leur entreposage. Le tableau 15 résume les résultats pour chacune des cinq molécules dont l'activité a pu être testée.

Tableau 15 : Activité anticancéreuse des molécules isolées

Molécule	Hoechst (µM)		
	A-549	DLD-1	WS-1
Pinocembrine	62±19	100±20	>200
Pinobanksine	>200	>200	>200
Pinosylvine monométhyle éther	27±3	18±2	24±6
Acide 12-hydroxyabiétique	>200	>200	>200
Acide 15-hydroxydehydroabiétique	>200	>200	>200

À la lumière des résultats décrit au tableau 15, une molécule isolée démontre un certain potentiel. La pinosylvine monométhyle éther montre une toxicité modérée à la fois sur les cellules cancéreuses et sur les cellules saines. Ces résultats sont intéressants car cette molécule représente l'un des produits majoritaires du *Pinus banksiana*. En effet, ces produits se retrouvent dans les extraits hexane, dichlorométhane et méthanolique de cet arbre. La pinosylvine monométhyle éther pourrait être en partie responsable de l'activité anticancéreuse. Cependant on ne peut pas éliminer la possibilité que d'autres composés pourraient être impliqués dans l'activité de cette fraction observée lors des tests préliminaires.

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce mémoire s'inscrit d'emblée dans un programme de recherche portant sur la valorisation de la biomasse résiduelle engendrée par l'activité de coupe forestière. Les résultats d'une première cueillette ont permis de mettre en évidence le potentiel anticancéreux de deux espèces, le *Pinus banksiana* et le *Pinus resinosa*. Les extraits testés ont en effet montré une action sélective sur les cellules cancéreuses. Le *Pinus banksiana*, sur lequel se sont ensuite concentrés nos efforts, a été soumis à une analyse phytochimique. Cela a conduit à l'identification de dix molécules. Parmi celles-ci, la pinosylvine monométhyle éther, constituant majoritaire de l'extrait hexane et DCM, a démontré une activité anticancéreuse. Par contre, le faible rendement d'extraction primaire combiné à une activité modeste limite le potentiel de valorisation du bois de cette espèce.

Sur les dix molécules que ce projet a permis d'isoler dans le bois interne de *Pinus banksiana*, cinq n'avaient jamais été identifiées dans cette espèce. Il s'agit du matairésinol, du pinorésinol, de l'acétate de pinobanksine, de l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique et de l'acide imbricatolique. Ces substances ont, par contre, été isolées dans d'autres espèces du genre *Pinus*. La pinosylvine monométhyle éther (Lindstedt, 1951), la pinocembrine (Erdtman, 1943), la pinobanksine (Erdtman, 1943), acides 13-keto-8(14)-podocarpenoïque (Ikeda, 1977) ont été aussi isolés mais étaient déjà connus dans la littérature.

La seconde cueillette de huit espèces cette fois, a permis d'obtenir des résultats qui pourraient contribuer au développement de nouveaux projets au laboratoire LASEVE. Sur les huit espèces récoltées, deux espèces se sont démarquées lors des tests anticancéreux :

l'extrait hexane de *Picea mariana* agit de façon sélective sur les cellules cancéreuses et les extraits (DCM et MeOH) du *Pinus banksiana* y ont confirmé leur potentiel anticancéreux. Les résultats du criblage antioxydant mettent en évidence les extraits méthanoliques et aqueux de trois espèces : *Abies balsamea*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera*. Une forte activité antioxydante est également remarquée avec les extraits méthanoliques *Picea glauca*, *Picea mariana* et *Populus tremuloïdes*. Le pouvoir antioxydant de ces extraits est élevé et pourrait ces matrices végétales pourraient s'avérer une source intéressante d'antioxydant naturel. De surcroît, les extraits de *Thuja occidentalis* montrent, pour leur part, un pouvoir antibactérien sur *S. Aureus* et *E. Coli*. Globalement, les résultats de la seconde cueillette étayent ce que les résultats de la première avaient laissé entrevoir : ces résidus forestiers possèdent un fort potentiel pour la découverte de produits bioactifs.

À la lumière des quelques résultats découlant de ce projet, les travaux de recherche sur la valorisation des résidus de l'industrie forestière apparaissent prometteurs. Ce mémoire s'est concentré plus spécifiquement sur la valorisation du bois interne de pin gris. Des molécules majoritaires présentant une activité anticancéreuse en ont été extraites. Plusieurs espèces échantillonnées ont démontré des activités anticancéreuse, antibiotique ou antioxydante et justifieraient que des projets plus approfondis soient amorcés.

BIBLIOGRAPHIE

Banfi, S.; Caruso, E.; Biccacurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V. ;

2006, Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria; *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* volume 85, numéro 1, pages 28-38

Balandrin, M. F.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; **1993**, In Human Medicinal Agents from Plants; ACS Symposium Series 534, American Chemical Society, Washington, D.C.; pages 2-12.

Bioxel Pharma inc, 2006, Profil financier : Principales raisons d'investir dans la Société, <http://www.bioxelpharma.com/docs/fr/corporate/21.investisseur.pdf>, visité le 25 février 2007.

Bower, C. L; Rowe J. W. , **1967**, Extractives of jack pine bark: occurrence of (+)-13-epimanoyl oxide and related labdane diterpenes. *Phytochemist*, volume 6, numéro 1, pages 151-153.

Chalandre, M-C, **1999**, Éléments de Botanique : cours de première année de pharmacie, http://www.123bio.net/cours/bv/bv_6.html, UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé, ANGERS, visité le 25 février 2007

Chapman, R. A; Manchester, D. F.; Lumsden, R. H.; Nugent, H. M. and Bolker, H. I., **1974** An Improved method for the analysis of wood extractives and its application to jack pine (*pinus banksiana* lamb.). *Pulp and Paper Reports* , 20 pages.

- Chapman, R. A.; Nugent, H. M.; Clayton, D. W.; Manchester, D. F.; Redmon, W. A., **1974**, Non-structural chromophoric substances in jack pine wood and pulp : The role of galangin in the coloration of heartwood bisulphite pulp. *Pulp and paper reports*, 16 pages.
- Cheung, A.H.T.; Miyase, T.; Lenguyen, M.P.; Smal, M.A.; **1993**, Further acidic constituents and neutral components of *Pinus massoniana* resin. *Tetrahedron*, volume 49, numéro 36, page 7903-7915.
- Commission d'étude sur la gestion de la forêt publique québécoise, **2004**, Rapport de la commission d'étude sur la gestion de la forêt publique québécoise, Québec, 303 p, ISBN 2-550-43626-1
- Deschesne, L., **2003**, Les produits forestiers non ligneux au Canada – Une industrie en développement, Nouvelles Express, Service canadien des forêts, Bulletin no 28, 1 page.
- Erdtman, H., **1946**, Die phenolischen Inhaltsstoffe des Kiefernkerneholzes VII. Das Kernholz von *Pinus nigra* Arn., *Pinus Montana* Mill., *Pinus Banksiana* Lamb., und *Pinus palustris* Mill., *Svensk Kemisk Tidskrift*, volume 56, pages 95- 101.
- Gagnon, Daniel, **2004**, La forêt naturelle du Québec, un survol, *Rapport préparé pour la Commission d'étude sur la gestion de la forêt publique québécoise*, 74p.
http://www.commission-foret.qc.ca/pdf/Gagnon_foret_naturelle_final.pdf

- Grieve, M., **1967**, *A Modern Herbal – Volume 2*, Third Edition, Hafner publishing co, New York, 860 pages.
- Guz, R. N.; Stermitz, F. R., **2000**, Spectral comparisons of coniferyl and cinnamyl alcohol epoxide derivative with a purported cis-epoxyconiferyl alcohol isolate, *Phytochemistry*, volume 54, pages 897-899.
- Harvey, A., **2000**, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, *Drug Discovery Today*, volume 5, numéro 7, pages 294-300
- Hatton, J. V.; Hunt, K., **1993**, Chemical properties of juvenile and mature wood from second-growth jack pine, *Cellulose Chemistry and Technology*, volume 27 numéro 1, pages 17-32.
- Hosie, R.C.; **1979**, Arbres indigènes du Canada, Fitzhenry and Whiteside, Publication officielle, Montréal, 380 pages.
- Herz, W.; Wahlborg, H. J.; Lloyd, W. D.; Schuller, W. H.; Hedrick, G. W.; **1965**, Resin Acids. IV. 12-Hydroxyabietic Acid and Its Reduction, *Journal of Organic Chemistry*, volume 30 pages 3190-3195.
- Ikeda, T.; Matsumura, F.; Benjamin, D. M., **1977**, Chemical basis for feeding adaptation of pine sawflies *Neodiprion rugifrons* and *Neodiprion swainei*, *Science*, volume 197 numéro 4302, pages 497-499.
- Kostova I.; Dinchev D.; Mikhova B.; Iossifova T., **1995**, Epoxyconiferyl alcohol from *Fraxinus oxycarpa* bark, *Phytochemistry*, Volume 38, numéro 3, pages 801-802.
- Kostova I.; Dinchev D.; Mikhova B.; Iossifova T., **2000**, Erratum to “Epoxyconiferyl alcohol from *Fraxinus oxycarpa* bark”, *Phytochemistry*, volume 53, numéro 7, page 827.

Kunkel, G., **1984**, Plant for human consumption, Koeltz scientific book, Koenigstein, 393 pages.

Law, K.-N.; Valade, J. L., **1994**, Status of the utilization of jack pine (*Pinus banksiana*) in the pulp and paper industry, *Canadian Journal of Forest Research*, volume 24, numéro 10, pages 2078-2084

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 Medica*, volume 69 numéro 5, 402-407.

Lindberg, L. E.; Willfor, S. M.; Holmbom, B. R.; **2004**, Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, volume 31: pages 137–147

Lindstedt, G; Misiorny, A., **1951**, Constituent of Pine Heartwood, *Acta Chemica Scandinavica*, volume 5, pages 121-128.

Mamelona, J.; Pelletier, E.; Girard-Lalancette, K.; Legault, J.; Karboune, S.; Kermasha, S.; **2007**, Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, *Food Chemistry* volume 104, numéro 3, 2007, pages 1040-1047

Marie-Victorin; **1995**, Flore Laurentienne, 3^e Edition, Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 1093 pages. (Édition originale parue en 1935)

Moerman, D. **1998**, Native american ethnobotany, Timber press, Oregon, 927 pages

- Neacsu, M.; Eklund, P. C.; Sjöholm, R. E.; Pietarinen, S. P.; Ahotupa, M. O.; Holmbom, B.R.; Willför, S. M.; **2007**; Antioxidant flavonoids from knotwood of jack pine and European aspen; *Holz als Roh-und Werkstoff*, Volume 65, Number 1; pages 1 à 6
- 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, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; volume 49, pages 4619-4626.
- Pichette, A.; Larouche, P.-L., Lebrun, M.; Legault, J.; **2006**, Composition and antibacterial activity of Abies balsamea essential oil, *Phytotherapy Research*; volume 20, numéro 5, pages 371 - 373
- Rowe, J. W.; Bower, Carol L. and Wagner E. R., **1969**, Extractives of jack pine bark: Occurrence of cis- and trans-pinosylvin dimethyl ether and ferulic acid esters. *Phytochemistry*, volume 8, numéro 1, pages 235-241
- Rowe, J. W.; Nagasampagi, B.A.; Burgstahler, A.W.; Fitzsimmons, J.W., **1971**, Derivatives of nordehydroabietane from pine bark, *Phytochemistry*, volume 10 numéro 7, pages 1647-1651
- Rudloff, E.; Sato A., **1963**, The Heartwood extractives of *Pinus banksiana* Lamb., *Canadian Journal of Chemistry*, volume 41, pages 2165-2174.
- Rudloff, E.; Sato A., **1965**, A., Chemical composition of the heartwood extractive of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa*, *Canadian Wood Chemistry. Symposium.*, 1st., Toronto, pages 69-73 (discussion 74)

- Rudolph, T. D.; Laidly, P. R.; 1990, *Silvic of North America : Volume 1 : Conifer : Jack Pine*, http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/pinus/; visité le 30 mai 2006.
- Sarkar, S. K.; Malhotra, S. S., 1979, Gas-Liquid chromatographic method for separation of the organic acid and its application to the pine needle extracts, *Journal of Chromatography*, volume 171, pages 227-232.
- Savidge, R.A.; 1989, Coniferin, a biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in conifers, *Canadian Journal of Botany*, volume 67, numéro 9, pages 2663-2668.
- Schuh, Beth A.; Benjamin, D. M. , 1984, The chemical feeding ecology of *Neodiprion dubiosus* Schedl, *N. rugifrons* Midd., and *N. lecontei* (Fitch) on jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.), *Journal of Chemical Ecology*, volume 10, numéro 7, pages 1071-1079.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; 1991, Spectrometric identification of organic compounds, 5th Edition, John Wiley & Sons, New York, 419 pages.
- 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, *Journal of Ethnopharmacology*, volume 103, numéro 1, pages 99-102
- Su, W.C.; Fang, J.M; Cheng, Y.S.; 1994, Labdanes from *Cryptomeria japonica*, *Phytochemistry*, volume. 37 numméro 4, pages 1109-1114

- Thompson, Robert S.; Anderson, Katherine H. and Bartlein, Patrick J.; **1999**, Atlas of Relations Between Climatic Parameters and Distributions of Important Trees and Shrubs in North America, *U.S. Geological Survey Professional Paper 1650 A&B*, <http://pubs.usgs.gov/pp/p1650-a/>, visité le 25 avril 2007.
- Tungland, B. C.; **2000**, Inulin References - A comprehensive Scientific Review, http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html , Bristol University of Bristol, Grande-Bretagne, visité le 25 avril 2007.
- Umezawa, Toshiaki.; Davin, Laurence B.; Lewis, Norman G.; **1991** Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with Forsythia intermedia cell-free extracts; *Journal Biological Chemistry*., volume 266, numéro 16, 10210-10217,
- Wagner, Hidebert; Chari, Vendantha Mohan; Sonnenbichler, Johann;; **1976**, ^{13}C -NMR-Specten Natürlich Vorkommender Flavanoide, *Tetrahedron Letters*, numéro 21, pages 1799-1802
- Wagner, H; Bladt, S.; Zgainski, E. M.; **1984**, Plant Drug Analysis, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 322 pages
- Wichtl, M.; Anton, R.; **1999**, Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, *Technique et documentation*, Cachan : Éditions médicales internationales, Paris, 636 pages.
- Whetten, R.W.; MacKay, J.J.; Sederoff, R.R.; **1998**, Recent advances in understanding lignin biosynthesis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, volume 49, pages 585-609.

ANNEXE 1

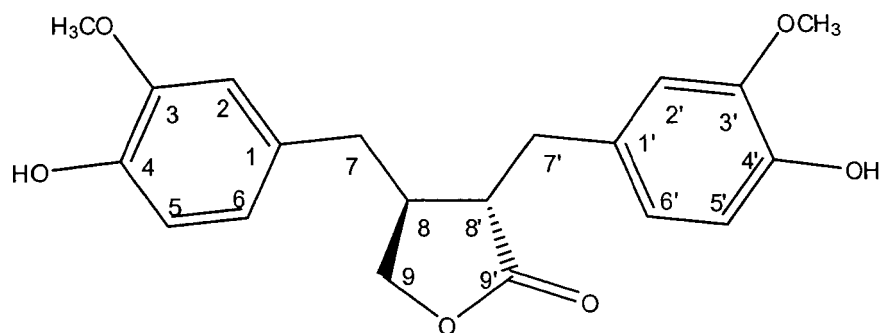
Liste des abréviations

Abréviation	Description
CCM	Chromatographie sur couche mince
cm	Centimètre
CHCl ₃	Chloroforme
DCM	Dichlorométhane
δ_C	Déplacement chimique en carbone (ppm)
δ_H	Déplacement chimique en proton (ppm)
km	Kilomètre
GC	Gas Chromatography
g	Gramme
Hex	Hexane
Hz	Hertz
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
H ₂ O	Eau
IC ₅₀	Concentration de produit qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire
LASEVE	Laboratoire de séparation des essences végétales
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MIC ₈₀	Concentration où on observe une inhibition de 20% de la prolifération bactérienne de façon significative
MS	Mass Spectroscopy
PFNL	Produits forestiers non ligneux
ORAC	Oxygen Radical Absorption Capacity
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
T _R	Temps de rétention (min)
UQAC	Université du Québec à Chicoutimi
μM	Micromolaire (10^{-6} mol/L)

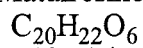
ANNEXE 2

IDENTIFICATION RMN DES MOLÉCULES

CS1CA ET CS1EB : MATAIRÉSINOL



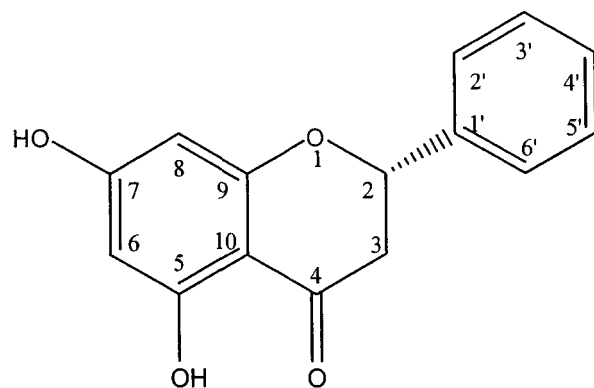
Matairésinol



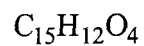
Masse moléculaire: 358.38

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	130,1	-	C
2	111,8	6,57 d	CH
3	147,6	-	C
4	144,8	-	C
5	114,8	6,70 D	CH
6	120,8	6,52 Dd	CH
7	37,5	2,55 m	CH ₂
8	41,1	2,50 m	CH
9	71,5	4,17; 3,94 T	CH ₂
1'	129,4	-	C
2'	112,5	6,69 d	CH
3'	147,6	-	C
4'	145,0	-	C
5'	114,7	6,72 D	CH
6'	121,6	6,59 D	CH
7'	33,9	2,90; 2,83 Dd	CH ₂
8'	46,3	2,67 Q	CH
9'	180,3	-	C
OCH3	54,8	3,79 S	CH ₃
OCH3'	55,0	3,80 S	CH ₃

CS1CB : PINOCEMBRINE



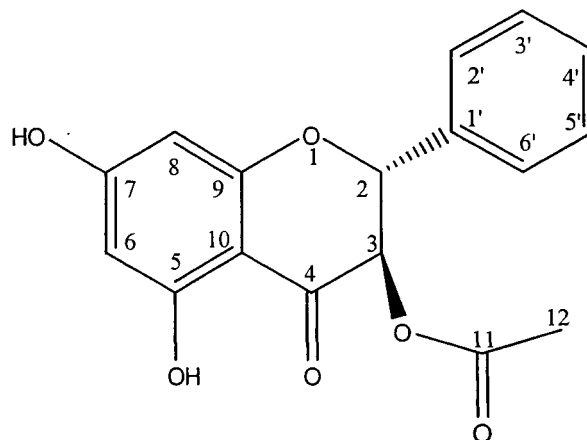
Pinoembrine



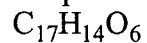
Masse moléculaire: 256,25

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	-	-	O
2	78,8	5,15 Dd	CH
3	42,9	2,52 – 2,8 D	CH ₂
4	195,5	-	C
5	163,7	-	C
6	96,1	5,69 d	CH
7	166,8	-	C
8	95,2	5,719 d	CH
9	162,9	-	C
10	102,0	-	C
1'	138,3	-	C
2'	125,8	7,18 m	CH
3'	128,4	7,15 m	CH
4'	128,4	7,09 m	CH
5'	128,4	7,12 m	CH
6'	125,8	7,21 m	CH

CS1CC : ACÉTATE DE PINOBANKSINE



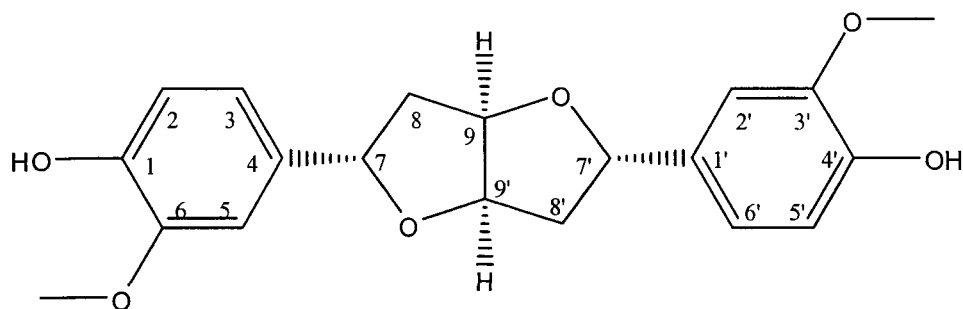
Acétate de pinobanksine



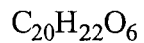
Masse moléculaire: 314,29

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplicité
1	-	-	Oxygène
2	81,1	5,43 D	CH
3	72,4	5,85 D	CH
4	191,4		C=O
5	162,7		C
6	95,4	5,96 d	CH
7	168,2		C
8	96,5	5,98 d	CH
9	164,1		C
10	100,6		C
11	169,4		C=O (acétate)
12	18,8	1,97 S	CH3
1'	135,9		C
2'	127,3	7,53 m	CH
3'	128,2	7,43 m	CH
4'	129,0	7,43 m	CH
5'	128,2	7,43 m	CH
6'	127,3	7,53 m	CH

CS1EB : PINORÉSINOL



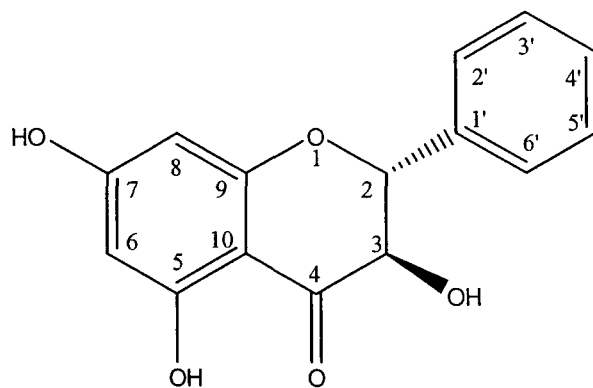
Pinorésinol



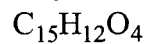
Masse moléculaire: 358,38

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	133,3	-	C
2	109,7	7,00 d	CH
3	147,4	-	C
4	145,9	-	C
5	114,6	6,78 D	CH
6	118,7	6,84 Dd	CH
7	71,3	3,81 Dd, 4,21 Dd	CH ₂
8	85,8	4,67 d	CH
9	54,4	3,1 q	CH
10	55,4	3,85 S	O-CH ₃
1'	133,3	-	C
2'	109,7	7,00 d	CH
3'	147,4	-	C
4'	145,9	-	C
5'	114,6	6,78 D	CH
6'	118,7	6,84 Dd	CH
7'	85,8	4,67 d	CH
8'	71,3	3,81 Dd, 4,21 Dd	CH ₂
9'	54,4	3,1 q	CH
10'	55,4	3,85 S	O-CH ₃

CS1EC : PINOBANKSINE



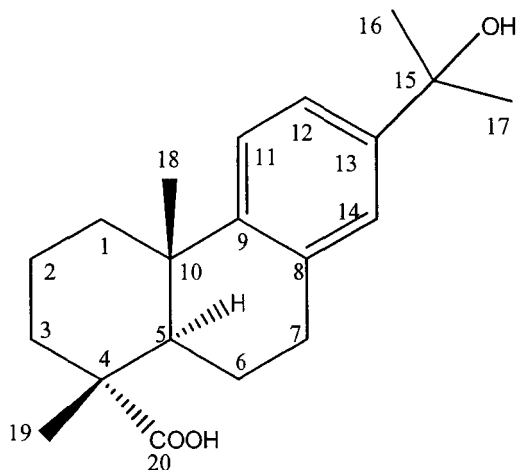
Pinobanksine



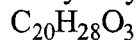
Masse moléculaire: 256,25

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	-	-	Oxygène
2	85,1	5,08 D	CH
3	73,7	4,56 D	CH
4	198,2		C
5	165,4		C
6	97,5	5,95 S	CH
7	168,8		C
8	96,4	5,92 S	CH
9	164,4		C
10	101,9		C
1'	138,6		C
2'	128,9	7,55 m	CH
3'	129,4	7,42 m	CH
4'	129,9	7,38 m	CH
5'	129,4	7,42 m	CH
6'	128,9	7,55 m	CH

CS6CC : ACIDE 15-HYDROXYDEHYDROABIÉTIQUE



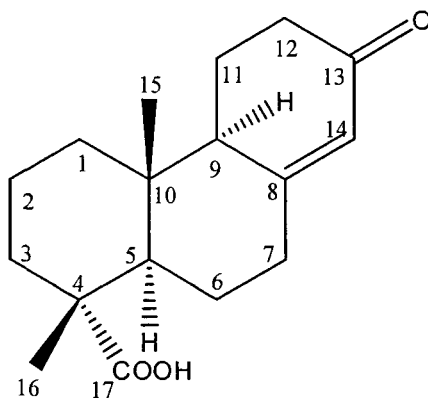
Acide 15-hydroxydehydroabietique



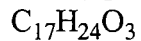
Masse moléculaire: 316,43

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	37,9	2,36 m ; 1,53m	CH ₂
2	18,6	1,80 m	CH ₂
3	36,7	1,85 m ; 1,75 m	CH ₂
4	47,4		C
5	44,6	2,27 Dd	CH
6	21,8	1,90 m ; 1,59 m	CH ₂
7	30,2	2,96 m	CH ₂
8	134,8		C
9	147,8		C
10	37,0		C
11	124,2	7,24 m	CH
12	122,0	7,26 m	CH
13	146,1		C
14	125,0	7,19 m	CH
15	72,4		C
16	31,7	1,60 S	CH ₃
17	31,7	1,60 S	CH ₃
18	25,1	1,25 S	CH ₃
19	16,3	1,32 S	CH ₃
20	184,3		C

CS6CD : ACIDE 13-KETO-8(14)-PODOCARPEÑOÏQUE



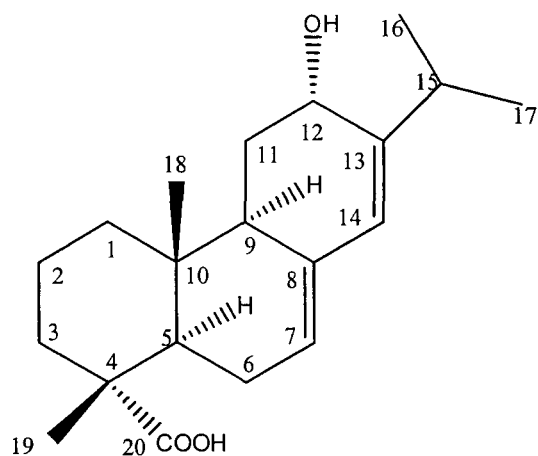
Acides 13-keto-8(14)-podocarpenoïque



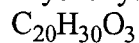
Masse moléculaire: 276,37

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	38,4	1,80, 1,22 m	CH ₂
2	18,0	1,60 m	CH ₂
3	37,0	1,76 m	CH ₂
4	47,1		C
5	48,0	2,08 m	CH
6	24,2	1,62, 1,47 m	CH ₂
7	35,3	2,52, 2,37 Dd	CH ₂
8	165,1		C
9	51,8	2,19 m	CH
10	38,4		C
11	20,5	2,02, 1,75 m	CH ₂
12	36,8	2,46, 2,28 m	CH ₂
13	200,1		C
14	126,4	5,89 br s	CH
15	15,7	0,86 S	CH ₃
16	16,9	1,24 S	CH ₃
17	184,3		C

CS6CE : ACIDE 12-HYDROXYABIÉTIQUE



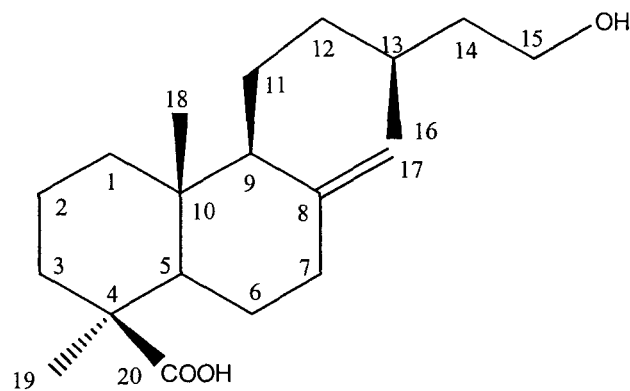
Acide 12-hydroxyabietique



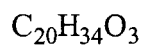
Masse moléculaire: 318,45

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	37,2	1,81 m ; 1,66 m	CH ₂
2	17,8	1,62 m	CH ₂
3	38,0	1,89 m	CH ₂
4	40,8		C
5	45,1	2,16 m	CH
6	25,5	2,12 m ; 1,87 m	CH ₂
7	123,1	5,51 T	CH
8	134,8		C
9	43,5	2,38 m	CH
10	33,7		C
11	30,7	1,86 m	CH ₂
12	65,4	4,24 T	CH
13	143,4		C
14	125,3	5,85 S	CH
15	32,2	2,41 m	CH
16	21,4	1,07 D	CH ₃
17	20,6	1,11 D	CH ₃
18	13,4	0,854 S	CH ₃
19	16,0	1,27 S	CH ₃
20	181,0		C

CS6CH : ACIDE IMBRICATOLIQUE



Acide imbricatolique



Masse moléculaire: 322,48

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicité
1	39,0	1,89, 1,10 m	CH ₂
2	19,8	1,90, 1,54 m	CH ₂
3	37,9	2,18, 1,07 m	CH ₂
4	44,1		C
5	56,3	1,35 m	CH
6	26,0	2,00, 1,92 m	CH ₂
7	38,7	2,43, 1,92 m	CH ₂
8	148,2		C
9	56,5	1,56 m	CH
10	40,5		C
11	21,0	1,55, 1,31 m	CH ₂
12	36,3	1,50, 0,97 m	CH ₂
13	30,2	1,55 m	CH
14	39,4	1,67, 1,38 m	CH ₂
15	61,1	3,71	CH ₂
16	19,8	0,93 D	CH ₃
17	106,3	4,86, 4,53	CH ₂
18	12,7	0,63 S	CH ₃
19	28,9	1,27 S	CH ₃
20	183,5		C