

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

FRANÇOIS SIMARD

B. Sc. (CHIMIE)

ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTICANCÉREUX DES EXTRACTIBLES DU BOIS
DE PIN ROUGE

MARS 2007



Mise en garde/Advice

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

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

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

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

RÉSUMÉ

Le cancer affecte la vie d'un grand nombre de personnes. Au Canada, les taux d'incidence actuels indiquent que 38 % des canadiennes et 44 % des canadiens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie. Cette forte incidence justifie aisément la recherche de nouveaux traitements pour cette pathologie. Les produits naturels constituent une bonne source pour la découverte de nouveaux agents anticancéreux. On sait qu'actuellement, ils représentent 60 % du marché. La forêt boréale est très peu étudiée pour les propriétés anticancéreuses des plantes qui la composent et constitue donc, une banque potentielle de nouveaux anticancéreux. La valorisation d'espèces de la forêt boréale sous forme de produits pharmaceutiques pourrait très bien complémer l'industrie ligneuse qui occupe une place très importante dans l'économie de régions ressources comme le Saguenay Lac-St-Jean. C'est dans ce but que le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi a développé une solide expertise pour la découverte de nouveaux agents anticancéreux d'origine naturelle. Dans le cadre de ces travaux, l'évaluation de l'activité anticancéreuse des extraits de bois de différents conifères a permis de constater que l'extrait méthanolique de pin rouge (*Pinus resinosa*) était potentiellement intéressant. En effet, la concentration d'extrait qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire était de $41 \pm 6 \mu\text{g/ml}$ sur une lignée de cellules cancéreuses du poumon (A549) et de $47 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ sur une lignée de cellules cancéreuses du colon (DLD-2).

1). De plus, l'activité anticancéreuse de l'extrait méthanolique de pin rouge est sélectif envers les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines, WS1 (IC_{50} , $130 \pm 11 \mu\text{g/ml}$). Suite à ces résultats, l'extrait MeOH de pin rouge a été fractionné, d'abord par extraction liquide-liquide, puis par chromatographie sur colonne ouverte. Certaines des fractions obtenues ont montré des IC_{50} encore plus intéressantes et des travaux d'isolement supplémentaires ont été effectués. Ces travaux, guidés par l'activité anticancéreuse, ont mené à l'isolement de quatre composés : il s'agit du pinosylvin, du pinosylvin monomethyl ether, du (-)-nortrachelogenin ainsi que du pinobanksin. De plus, le pinosylvin monomethyl ether a aussi été isolé de l'extrait hexane. Le pinosylvin monométhyl ether est le composé qui a montré l'activité anticancéreuse la plus intéressante avec des IC_{50} de $25 \pm 4 \mu\text{M}$ contre A549 et de $20 \pm 1 \mu\text{M}$ contre DLD-1. Son IC_{50} se situe à $34 \pm 3 \mu\text{M}$ sur la lignée de cellules saines WS1. Son activité anticancéreuse, sur ces lignées cellulaires, est comparable à celle du resveratrol, un composé connu pour inhiber la croissance de plusieurs cellules cancéreuses. L'extrait à l'hexane de pin rouge a aussi été fractionné. L'activité anticancéreuse de ces fractions a été évaluée et leurs cytotoxicités sont moins grandes que pour l'extrait MeOH. Le contenu des fractions a été évalué sommairement par GC-MS et ces fractions sont composées majoritairement d'acides résiniques. En conclusion, les résultats obtenus suggèrent que le pinosylvin monomethyl ether est un des composés responsables de l'activité anticancéreuse observée pour l'extrait MeOH de bois de pin rouge et son développement en tant qu'anticancéreux pourrait permettre de valoriser cette essence.

REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier celui qui a transformé ce projet en une expérience agréable et très enrichissante, mon directeur André Pichette. Il est certainement le grand responsable de la passion que j'ai développé pour la recherche. Je tiens aussi à remercier le Dr Jean Legault et son équipe pour leurs précieuses collaborations toujours offertes avec enthousiasme. Particulièrement, Mme Angélique Longtin, M. Maxime Lebrun et Mme Catherine Dussault qui ont effectué les tests de bioactivité sur tous mes échantillons. Au laboratoire, il m'est impossible de ne pas mentionner l'aide inestimable que m'a apporté M. Serge Lavoie, tant pour ses connaissances en RMN que pour ses qualités générales de chercheur. Un merci spécial au Dr Vakhtang Mshvildadze pour son expérience précieuse et sans qui je n'aurais pu vivre la merveilleuse expérience de mon stage.

Je tiens à remercier sincèrement mon camarade Charles Sirois qui a été présent pour moi tant au laboratoire qu'en dehors ainsi que ma famille et tous mes amis pour leur soutien moral tout au long de ce projet.

Enfin, je remercie le conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur bourse d'étude.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ANNEXES	IX
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 PROBLÉMATIQUE.....	2
1.2 OBJECTIFS	5
1.2.1 Objectif général.....	5
1.2.2 Objectifs spécifiques.....	5
CHAPITRE II.....	6
REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 DESCRIPTION PHYSIQUE	7
2.2 DISTRIBUTION	7
2.3 UTILISATIONS.....	9
2.4 COMPOSITION CHIMIQUE DU GENRE <i>PINUS</i>	9
2.5 COMPOSITION CHIMIQUE DU PIN ROUGE.....	17
2.6 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE CHEZ LE GENRE <i>PINUS</i>	20
2.7 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU PIN ROUGE	23
2.8 LA RECHERCHE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTICANCÉREUX	23
CHAPITRE III.....	25
ARTICLE SCIENTIFIQUE	25
3.1 RÉSUMÉ	26
3.2 ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CYTOTOXIC COMPOUNDS FROM THE WOOD OF <i>PINUS RESINOSA</i>	27
CHAPITRE IV	32
AVANCEMENT DES TRAVAUX	32
4.1 MATERIEL ET METHODES	33
4.1.1 Extractions de bois de conifères.....	33
4.1.2 Travaux de fractionnement et d'isolement effectués sur l'extrait hexane de pin rouge	34

4.1.3 Autres activités biologiques des composés isolés	38
4.2 RÉSULTATS	40
4.2.1 Rendements et activités anticancéreuses des extraits de conifères.....	40
4.2.2 Fractionnement et identification des composés responsables de l'activité anticancéreuse de l'extrait MeOH de pin rouge	42
4.2.3 Résultats des travaux de fractionnement de l'extrait à l'hexane.....	44
4.2.4 Résultats des autres activités biologiques des composés isolés.....	51
CHAPITRE V	54
CONCLUSION	54
CHAPITRE VI.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	58
CHAPITRE VII	65
ANNEXES	65

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PRINCIPAUX ACIDES RÉSINIQUES RETROUVÉS CHEZ LE GENRE <i>PINUS</i>	12
TABLEAU 2 : ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES RECENSÉS CHEZ LE GENRE <i>PINUS</i>	22
TABLEAU 3 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES EN GC/MS	36
TABLEAU 4 : RENDEMENTS D'EXTRACTIONS DU BOIS DE QUATRE CONIFÈRES	41
TABLEAU 5 : CONCENTRATION DES EXTRAITS INHIBANT 50 % (IC ₅₀) DE LA CROISSANCE CELLULAIRE	42
TABLEAU 6 : ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DE LA PHASE AQUEUSE ET DE LA PHASE ETOAC AINSI QUE DES FRACTIONS DE CETTE DERNIÈRE	44
TABLEAU 7 : IC ₅₀ DU FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT HEXANE DE BOIS DE CŒUR DE PIN ROUGE	46
TABLEAU 8 : ANALYSE PAR GC/MS DE LA COMPOSITION DES FRACTIONS PRHex 1 à 7	48
TABLEAU 9 : ANALYSE PAR GC/MS DE LA COMPOSITION DES FRACTIONS PRHex 2.1 à 2.7	50
TABLEAU 10 : ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE DES COMPOSÉS ISOLÉS DE <i>PINUS RESINOSA</i>	53
TABLEAU 11 : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES COMPOSÉS ISOLÉS DE <i>PINUS RESINOSA</i>	53

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1: RMN DU PROTON DE PRHex 2.2.F.....	66
ANNEXE 2 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 1.....	67
ANNEXE 3 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 3.....	68
ANNEXE 4 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 4.....	69
ANNEXE 5 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 5.....	70
ANNEXE 6 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 6.....	71
ANNEXE 7 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION PRHex 7.....	72

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

1.1 Problématique

Au Québec, la forêt représente une ressource renouvelable dont l'exploitation a une grande importance tant au niveau économique que social. Ceci est d'autant plus vrai dans la région du Saguenay Lac St-Jean où 80 % du territoire, c'est-à-dire 99 700 km², est recouvert de terrains forestiers productifs et accessibles. Ce couvert forestier est à 94 % de type boréal continu (MRNFP, 2004). Cette richesse se traduit par environ 9000 emplois directement reliés à l'exploitation forestière dans la région qui est d'ailleurs première au Québec en termes de volume de bois récolté avec 20 % de la récolte totale de la province (CREDD, 2005). Ce bois est récolté pour son utilisation sous forme de produits ligneux, c'est-à-dire pour l'industrie du bois d'œuvre ou des pâtes et papier.

Les produits forestiers non ligneux (PFLN) sont définis comme étant des produits d'origine biologique autres que le bois et provenant de forêts ou d'autres terrains boisés (Turgeon, 2003). Il y a quatre principaux types de PFLN : les produits de l'alimentation (fruits sauvages, champignons, produits de l'éable, etc.), les produits ornementaux (arbres de Noël), les produits pharmaceutiques et nutraceutiques (extraits de *Taxus canadensis*, *Panax ginseng*, etc.) ainsi que les produits manufacturés et les matériaux (huiles essentielles, résines, etc.). Bien moins imposante que l'industrie de la matière ligneuse au Canada, l'exploitation des PFLN est en plein essor. Selon le Service canadien des forêts, la production annuelle se chiffrait à 241 millions de dollars en 2003 (Duchesne, 2003). Dans ce même rapport, le potentiel de récolte des PFLN est estimé à 1 milliard de dollars par année. Les régions ressources comme celle du Saguenay-Lac-St-Jean pourraient bénéficier d'un tel développement.

L'une des voies de développement la plus intéressante des PFNL est l'utilisation du potentiel biopharmaceutique de la forêt boréal pour la création de médicaments. L'exemple du paclitaxel (**1**) démontre bien le potentiel de ce genre de valorisation des produits non ligneux. Cet alcaloïde diterpénique, illustré à la figure 1, est également connu sous le nom de Taxol® (nom de la formulation). Il a été initialement identifié par le National Cancer Institute (NCI) dans le *Taxus brevifolia* (if du pacifique) et plus tard dans le *Taxus Canadensis* (if du Canada). Cette molécule, utilisé pour traiter les cancers du sein, des ovaires et du poumon, est devenue l'anticancéreux le plus vendu au monde avec des ventes atteignant 2,3 milliards de dollars en 2001 (Cameron *et al*, 2002a). Au cours de cette même année, la demande en taxol était de 400 kg en Amérique du Nord et en Europe (Cameron *et al*, 2002b). L'obtention de cette quantité nécessite environ 12 000 000 kg de biomasse (Cameron *et al*, 2002b). Il s'agit donc d'un potentiel de valorisation énorme pour l'if du Canada en tant que PFNL.

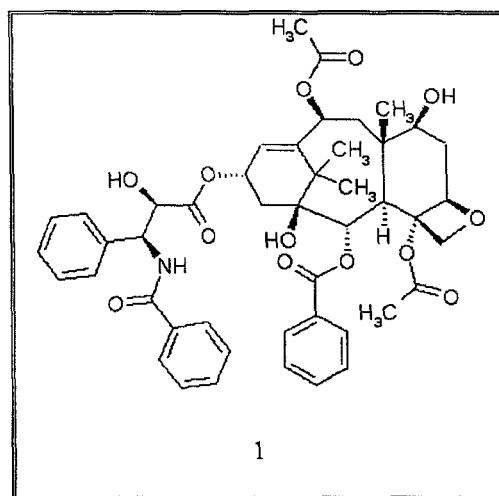


Figure 1 : Structure du Paclitaxel

Le paclitaxel ne représente pas un cas d'exception. De nombreux médicaments actuellement utilisés en clinique sont des produits naturels ou des dérivés. En effet, on estime qu'environ 60 % des médicaments utilisés dans le traitement du cancer sont d'origine naturelle (Newman *et al*, 2003). De plus, la proportion des espèces végétales sur terre ayant été étudiées pour leurs activités biologiques est évaluée à moins de 10 % (Harvey, 2000). La forêt boréale fait partie de cette richesse encore inexploitée. On retrouve environ 1875 plantes vasculaires indigènes du Québec (Gagnon, 2004) et très peu ont été étudiées à ce jour pour leurs potentiels biopharmaceutiques.

Mentionnons aussi que le cancer touche encore aujourd'hui un grand nombre de Canadiens et Canadiennes. Les taux d'incidence actuels indiquent que 38 % des Canadiennes et 44 % des Canadiens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie (McLaughlin *et al*, 2005). De plus, les traitements qui existent actuellement ne suffisent pas puisque les taux de mortalité actuels indiquent qu'un canadien sur quatre mourra du cancer (McLaughlin *et al*, 2005).

La nécessité de trouver des nouveaux composés d'intérêt pour le traitement du cancer, combinée au potentiel qu'offre la forêt boréale, ainsi qu'aux bienfaits économiques que peut en tirer le Saguenay Lac-St-Jean, ont mené le groupe de recherche du LASEVE à l'élaboration de ce projet de recherche. Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans un projet de recherche plus grand visant à évaluer le potentiel anticancéreux du bois d'espèces de conifères de la forêt boréale. C'est l'évaluation du potentiel d'utilisation du bois interne de pin rouge dans la lutte contre le cancer qui sera traité ici.

1.2 Objectifs

1.2.1 Objectif général

- Identifier les composés responsables de l'activité anticancéreuse du bois de pin rouge

1.2.2 Objectifs spécifiques

Pour atteindre l'objectif général du projet plusieurs étapes devaient être mises en œuvre. Voici les objectifs spécifiques de ces étapes :

- Extraire les composés du bois interne de pin rouge à l'aide de différents solvants
- Évaluer l'activité anticancéreuse de ces extraits
- Fractionner les extraits actifs et évaluer l'activité anticancéreuse des fractions obtenues
- Isoler et caractériser les composés responsables de l'activité des fractions bioactives

CHAPITRE II.

REVUE DE LITTERATURE

2.1 Description physique

Le pin rouge atteint en moyenne, une hauteur de 23 m et un diamètre de 33 cm. On ne retrouve pas de branche sur plus des trois quarts de son tronc lorsqu'il pousse en peuplement serré. Son écorce apparaît sous forme de larges écailles irrégulières d'un rouge-brun (figure 2) qui la distingue clairement de celles des autres pins. Ses aiguilles, aussi très caractéristiques, sont de couleur verte foncée. Elles sont réunies par deux et atteignent une longueur de 10 à 15 cm (Frère Marie Victorin, 1995).

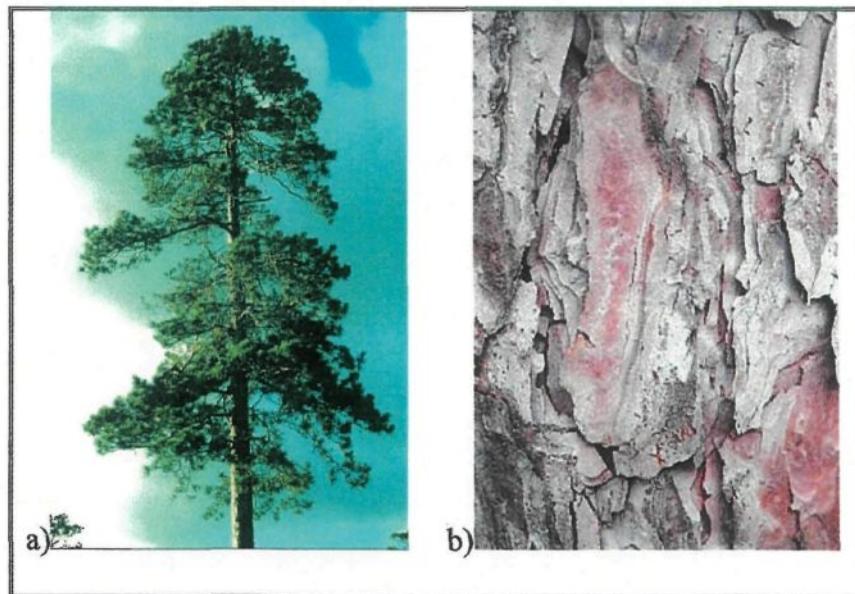


Figure 2: a) *Pinus resinosa* (O'Brien, date inconnue)
 b) écorce de *Pinus resinosa* (Wisconsin Department of Natural Resources, 2005)

2.2 Distribution

Le pin rouge est bien connu pour pousser dans les sols sableux, secs et peut même s'accommoder de sols très pauvres (Carpentier, 2000). Ils poussent souvent en petit groupe

peu étendu ou s'associent avec les trembles (*Populus tremuloïde* et *Populus grandidentata*), le pin gris (*Pinus banksiana*) et le pin blanc (*Pinus strobus*). La plupart des autres espèces qui cohabitent avec le pin rouge sont en mesure de vivre sous couvert forestier car ce dernier a souvent une taille imposante et tolère mal l'ombre. Sa distribution en Amérique du Nord s'étend de la Nouvelle-Écosse jusque dans les états du Wisconsin et du Michigan ainsi que jusqu'au lac Winnipeg. Au Québec, on en retrouve surtout autour de la Baie des Chaleurs, au Saguenay Lac-St-Jean, dans les environs de Rimouski et en Abitibi. La carte présentée à la figure 3 illustre la distribution du pin rouge en Amérique du Nord.

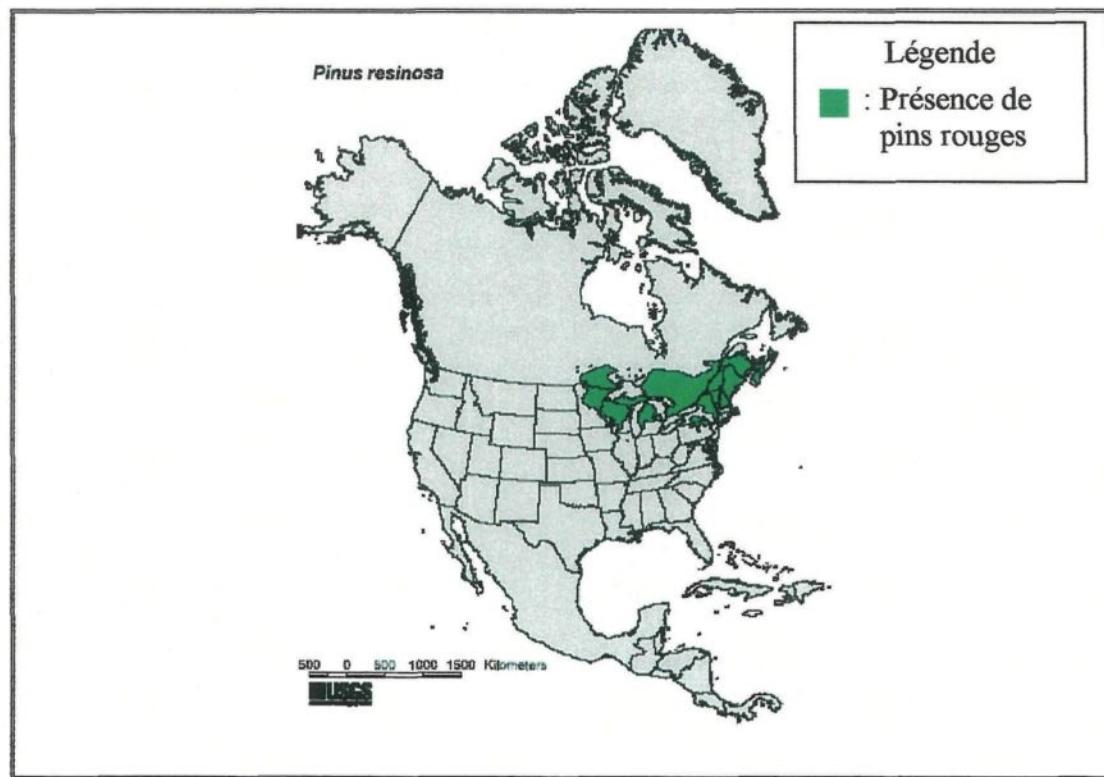


Figure 3 : Distribution du pin rouge en Amérique du Nord (Thompson *et al*, 1999)

2.3 Utilisations

La principale utilisation commerciale du pin rouge est la transformation en bois de construction. On l'utilise surtout comme bois de charpente, comme poteaux pour les fils électriques, comme poutres pour la construction de chemins de fer ou de chalets et comme bois pour les papetières (Burns *et al*, 1990). Le pin rouge a été planté intensivement aux États-unis et au Canada, non seulement pour son utilisation comme bois d'œuvre, mais aussi pour la protection de dune, pour contrer le vent et pour l'industrie des arbres de Noël. Il est souvent planté pour son aspect esthétique dans les sites de plein air et de villégiature. On le récolte aussi pour des utilisations plus fines comme l'extraction de la térébenthine. La térébenthine de tous les pins est utilisée comme solvant pour les cires, dans la composition de vernis et comme diluant à peinture.

Parmi toutes les espèces de pins employées dans la médecine amérindienne, le pin rouge n'était pas le plus utilisé. Cependant, quelques utilisations thérapeutiques des amérindiens ont été rapportées par Moerman en 2000. L'écorce interne, sous forme de cataplasme humide, était appliquée au thorax dans le traitement du rhume. Les aiguilles sèches en poudre étaient utilisées comme stimulant et les vapeurs de décoctions des aiguilles et de l'écorce auraient des vertus analgésiques dans le cas de maux de dos ou de tête.

2.4 Composition chimique du genre *Pinus*

Chimiquement, la famille des *Pinaceae*, dont les pins font partie, est surtout caractérisée par la présence de résines, de tanins, de terpènes, de lignans et de quelques

stilbènes. Dans tous les conifères, la résine, ou oléorésine, est présente de façon constitutive (synthétisée dans des structures anatomiques très spécialisées) ou induite (généralement provoquée par des attaques d'insectes ou d'agents pathogènes (LaFever *et al*, 1994)). La résine des pins est un mélange complexe de terpènes constitué d'une partie volatile appelée térebenthine et d'une partie non volatile appelée colophane (rosin). La térebenthine contient principalement des monoterpènes et quelques sesquiterpènes. Le β -pinène (2), l' α -pinène (3) (figure 4), et le 3-carène sont les plus répandus alors que les composés mineurs généralement présents sont le dipentène, le β -phellandrène, le terpinolène, l' α -terpinène, le p-cymène et le myrcène (4) (Zinkel *et al*, 1989a). La colophane contient essentiellement des acides diterpéniques (Phillips *et al*, 1999).

Les principaux tanins retrouvés dans les pins, surtout étudiés à partir du pin maritime (*Pinus maritima* L.), sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol. Les plus fréquemment retrouvés sont les procyanidines, c'est-à-dire des oligomères de catéchine ou d'épicatéchine (Romani *et al*, 2006).

Une très grande variété de terpènes a été identifiée dans le genre *Pinus*. Les compositions en terpènes volatils des aiguilles de plusieurs espèces de pin ont déjà été analysées (Yu *et al*, 2004; Ka *et al*, 2005; Hong *et al*, 2004; Tsitsimpikou *et al*, 2001). Les composés présents en plus grandes quantités sont des mono ou des sesquiterpènes et leurs concentrations varient d'une espèce à l'autre. Le β -pinène (2), l' α -pinène (3), et le β -phellandrène sont les plus répandus (figure 4). Plusieurs diterpènes ont été isolés tant dans la colophane que dans différentes parties des pins. On retrouve principalement dans la

littérature des diterpènes avec des squelettes de type abietane (5), pimarane (6), isopimarane (7) et labdane (8) (figure 4).

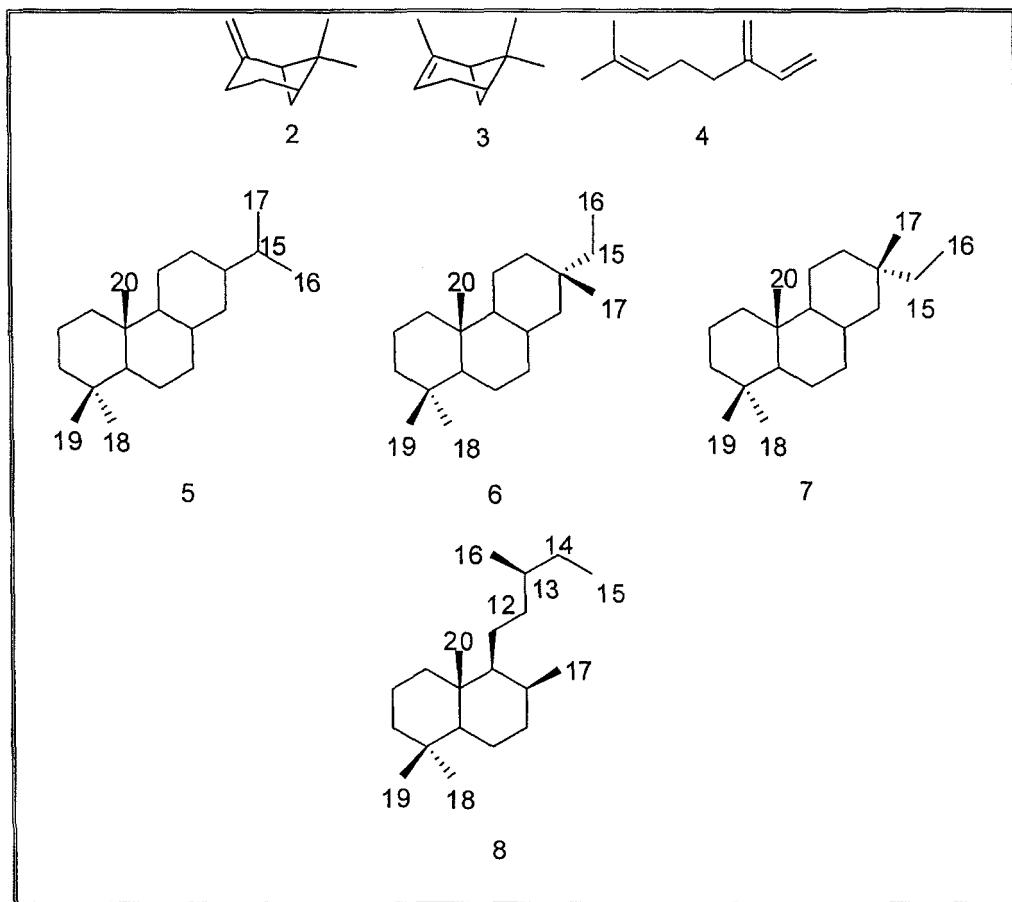


Figure 4 : Structures des sesquiterpènes et de diterpènes chez le genre *Pinus*

Les acides résiniques sont des diterpènes, souvent de type abietane, pimarane ou isopimarane, qui possèdent une fonction acide en position 18 ou 19 et qui se retrouvent dans les différentes parties des conifères. Certains acides résiniques moins communs, de type labdane possèdent une fonction acide en 15 ou deux fonctions acides en 15 et 18 ou en 15 et 19 (Zinkel *et al*, 1989b). La colophane est constituée presque essentiellement d'acides résiniques qui sont aussi les composés majoritaires du bois interne, de l'aubier et des aiguilles. À titre d'exemple, les extraits à l'hexane du bois interne et d'aubier de pin

sylvestre contiennent respectivement 47 % et 38 % d'acides résiniques, principalement les acides abiétique et déhydroabiétique (Nuopponen *et al*, 2004). Le tableau 1 présente une liste des acides résiniques les plus souvent rapportés chez le genre *Pinus*. La plupart des acides résiniques retrouvés dans les pins sont accompagnés par des traces des alcools et des aldéhydes correspondant (Zinkel *et al*, 1972).

Tableau 1 : Principaux acides résiniques retrouvés chez le genre *Pinus*

Nom commun	Nomenclature
	Type abietane
Acide abiétique	Acide abiétatri-7,13-én-18-oïque
Acide néoabiétique	Acide abiétadi -8(14),13(15)- én-18-oïque
Acide palustrique	Acide abiétadi -8(9),13- én-18-oïque
Acide lévopimarique	Acide abiétadi -8(14),12- én-18-oïque
Acide déhydroabiétique	Acide abiétadi -8,11,13- én-18-oïque
Type pimarane	
Acide pimarique	Acide pimaradi-8(14),15- én-18-oïque
Acide isopimarique	Acide isopimaradi-7(8),15- én-18-oïque
Acide sandaracopimarique	Acide isopimaradi-8(14),15- én-18-oïque

En plus de ces familles de diterpènes, quelques composés apparentés à ces structures ont été identifiés dans des espèces de pins (figure 5). Il y a l'acide abeoanticopalique (9) qui a un squelette de type labdane avec un des cycles ouverts et qui a été isolé dans le pin blanc (*Pinus strobus*) (Zinkel *et al*, 1987). Mentionnons aussi le *nor*-pimaradiénone (10) qui montre un squelette de pimarane avec un méthyl en C-4 en moins. Ce composé a été isolé dans la résine du pin maritime, *Pinus pinaster*, une espèce originaire d'Europe.

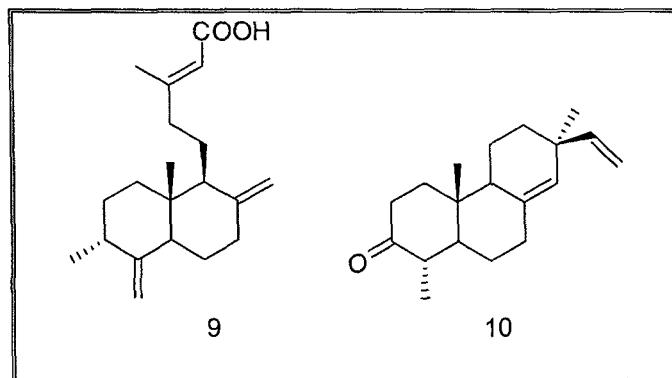


Figure 5 : Acides résiniques à squelettes modifiés

Contrairement aux diterpènes qui sont des composés retrouvés en grande quantité, les triterpènes sont isolés en faible quantité dans le genre *Pinus*. La variété des types de squelettes retrouvés est aussi moins grande. Les premiers à avoir été isolés étaient de type serratane. Le serratènediol (11) (figure 6) est un exemple de serratane qui a été retrouvé dans plusieurs espèces de pins (Rowe, 1989d). Conner *et al.*, en 1984, ont identifié quatre autres triterpènes du même type (12 à 15) dans l'écorce du pin argenté (*Pinus monticola*). Cheng *et al.* (1975) de leur côté, en ont décrit quatre (16 à 19) provenant d'un extrait à l'acétone de *Pinus luchuensis*. Cinq autres triterpènes (20 à 24) appartenant au type lanostane ont aussi été identifiés dans cette matrice (Wada et Tanaka, 2000).

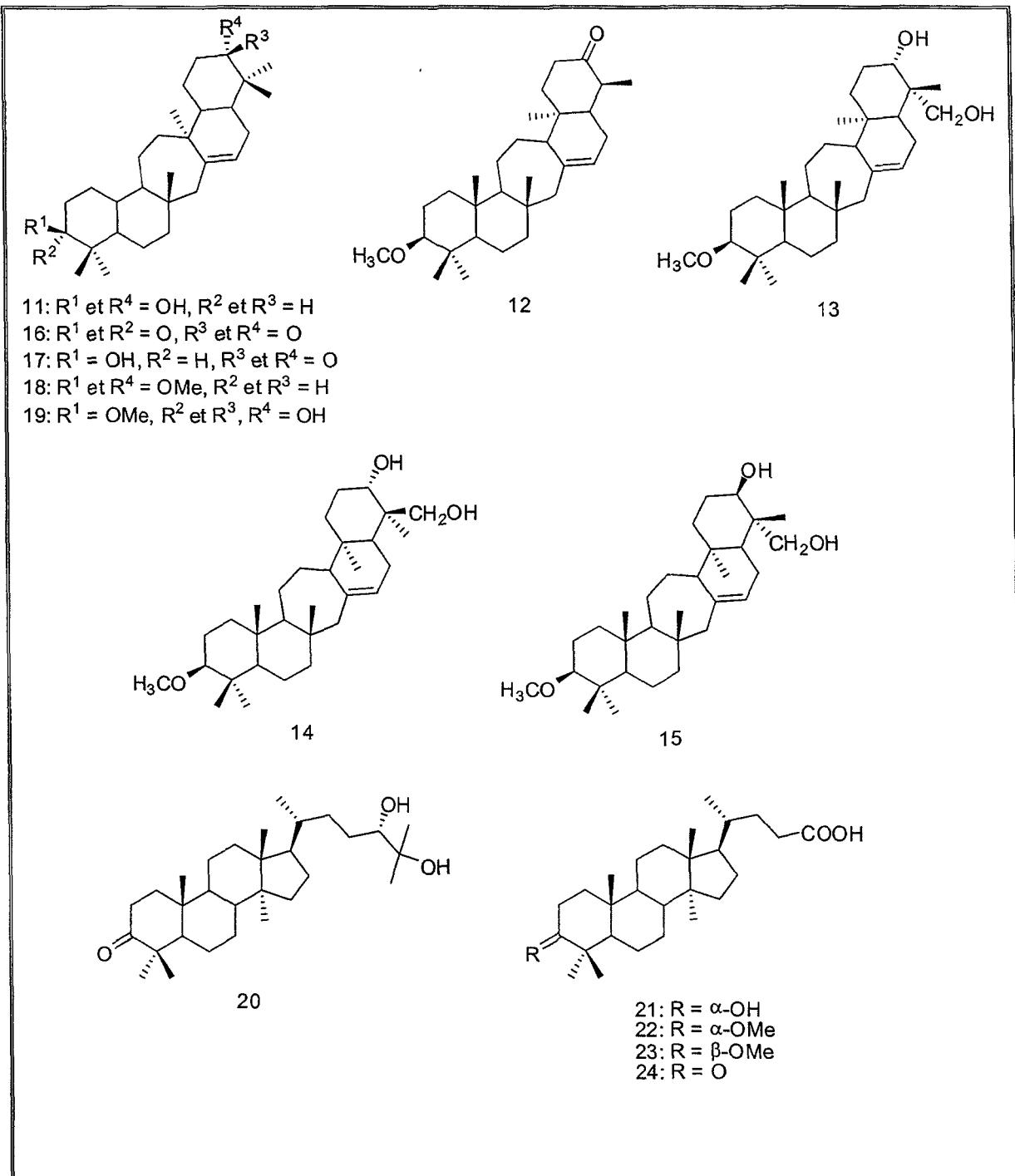


Figure 6 : Composés triterpéniques chez le genre *Pinus*

Les composés phénoliques retrouvés dans les pins sont très variés. Les lignans, qui sont dérivés des phénylpropanes, sont souvent présents en grande quantité. Ceux principalement rencontrés dans le bois de cœur, les nœuds et l'écorce sont le lariciresinol (25), l'isolariciresinol (26), le secoisolariciresinol (27) et le (-)-nortrachelogenin (28) (figure 7) (Suga *et al*, 1993; Willför *et al*, 2003a; Willför *et al*, 2003b). Le xylopyranoside de (+)-isolarisiresinol est un glycoside de lignan isolé dans un extrait au MeOH des aiguilles de *Pinus densiflora* (Jung *et al*, 2003). Les stilbènes constituent aussi des composés phénoliques majoritaires dans le bois interne de plusieurs pins. Certains agissent comme phytoalexin, c'est-à-dire que leur présence a été induite par un stress provenant d'une attaque fongique ou bactérienne. Les plus rencontrés dans le genre *Pinus* sont le pinosylvin (29), le pinosylvin monomethyl ether (30) et le pinosylvin dimethyl ether (31) (figure 7). Ces derniers sont des constituants caractéristiques du bois interne du genre *Pinus* (Rowe, 1989c).

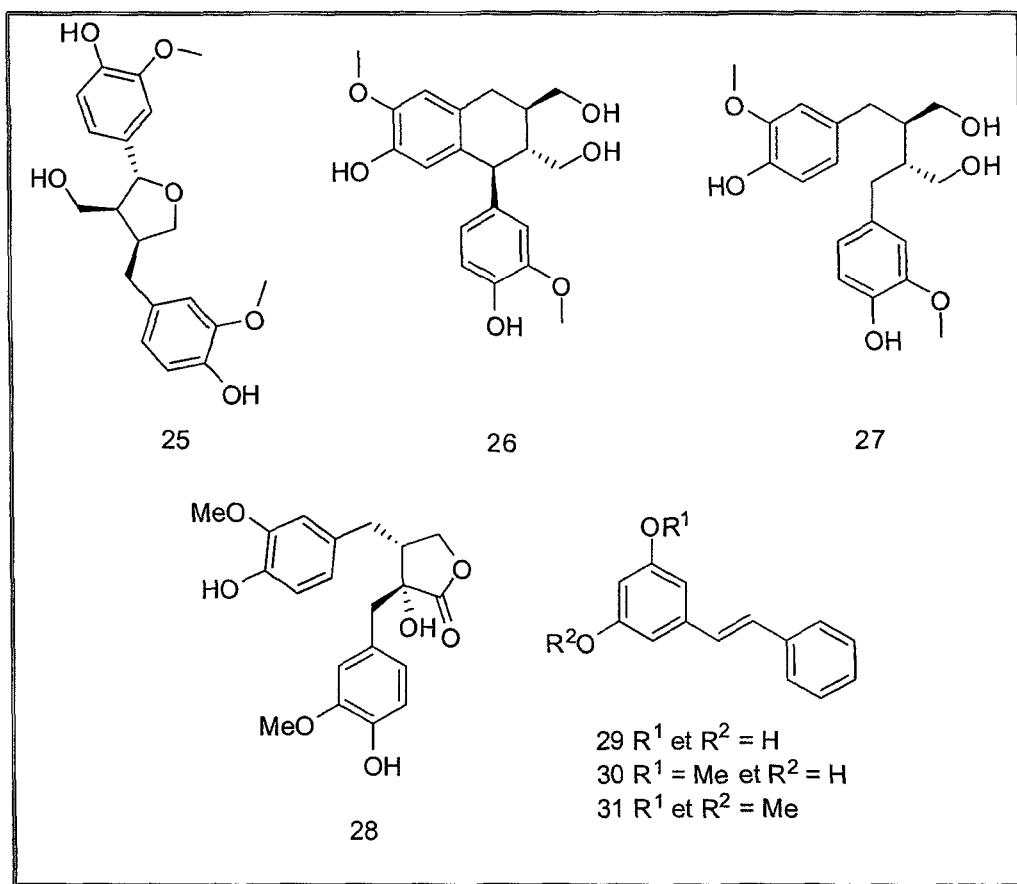


Figure 7 : Composés phénoliques retrouvé chez le genre *Pinus*

En terminant cette revue de littérature sur la composition chimique des pins, mentionnons l'identification d'une série d'alcaloïdes de type piperidine (figure 8). Les premiers à être identifiés furent l' α -pipecoline (32) et le (-)-pinidine (33) à partir des feuilles de *Pinus sabiniana* (Tallent *et al.*, 1955). Plusieurs autres alcaloïdes de ce type ont ensuite été identifiés (Tawara *et al.*, 1993) et Stermitz *et al.* ont déterminé leur présence dans plusieurs espèces de pins en 1994.

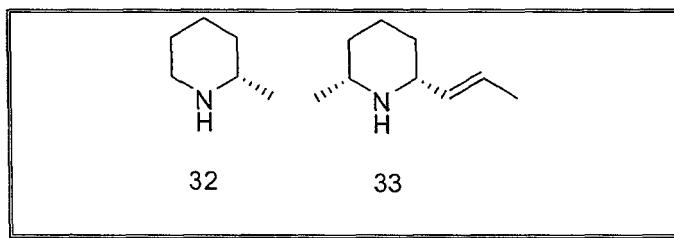


Figure 8 : Alcaloïdes présents dans le genre *Pinus*

2.5 Composition chimique du pin rouge

Il existe très peu d'études scientifiques sur la composition chimique et sur les activités biologiques du pin rouge d'Amérique. L'huile essentielle des aiguilles du pin rouge a été étudiée par Krauze-Baranowska *et al* en 2002. Le β -pinène (2), l' α -pinène (3) et le myrcène (4) sont les composés retrouvés majoritairement avec 42,4 %, 23,3 % et 14,5 % respectivement (figure 9). Il existe aussi une étude sur la composition en acides résiniques des aiguilles. Dans cette étude, quatre acides diterpéniques de type labdane ont été identifiés (Zinkel *et al*, 1985) : l'acide 8,13-époxy-14-labden-19-oïque (34) et l'acide 8,13- β -époxy-14-labden-19-oïque (35) qui sont deux épimères, l'acide communique (36) et l'acide imbricataloïque (37). Ces quatre labdanes constituent les principaux acides résiniques présents dans les aiguilles de pin rouge alors que les plus communs, les acides de type pimarane tricyclique, isopimarique ou abietadienoïque, sont présents en faibles proportions (moins de 10 %). Toujours dans les aiguilles, trois glycosides de flavonol, la quercétin-3-O-glucoside (38), la quercétin-3-O-rutinoside (39) et le 6-methylkaempferol-3-glucoside (40) ont été identifiés (Beninger *et al*, 1997). La présence du pinosylvin (29), du pinosylvin monométhyl ether (30) et du pinosylvin diméthyl ether (31) dans différentes parties est mentionnée dans plusieurs études (Blodget *et al*, 1997; Celimene *et al*, 1999;

Celimene *et al*, 2001; Lindberg *et al*, 2004). Ces stilbènes sont généralement produits dans la transition de l'aubier au bois de cœur. En plus de ces stilbènes, Lindberg *et al* (2004) ont aussi identifié les acides abiétique (41), déhydroabiétique (42) et levopimarique (43) ainsi que le (-)-nortrachelogenin (28) (Lindberg *et al*, 2004). D'autres composés phénoliques simples ont été trouvés dans le bois de cœur de pin rouge. Il s'agit de l'hydroquinone (44) (Rowe, 1989a) et du gaiacylglycérol (45) (Rowe, 1989b).

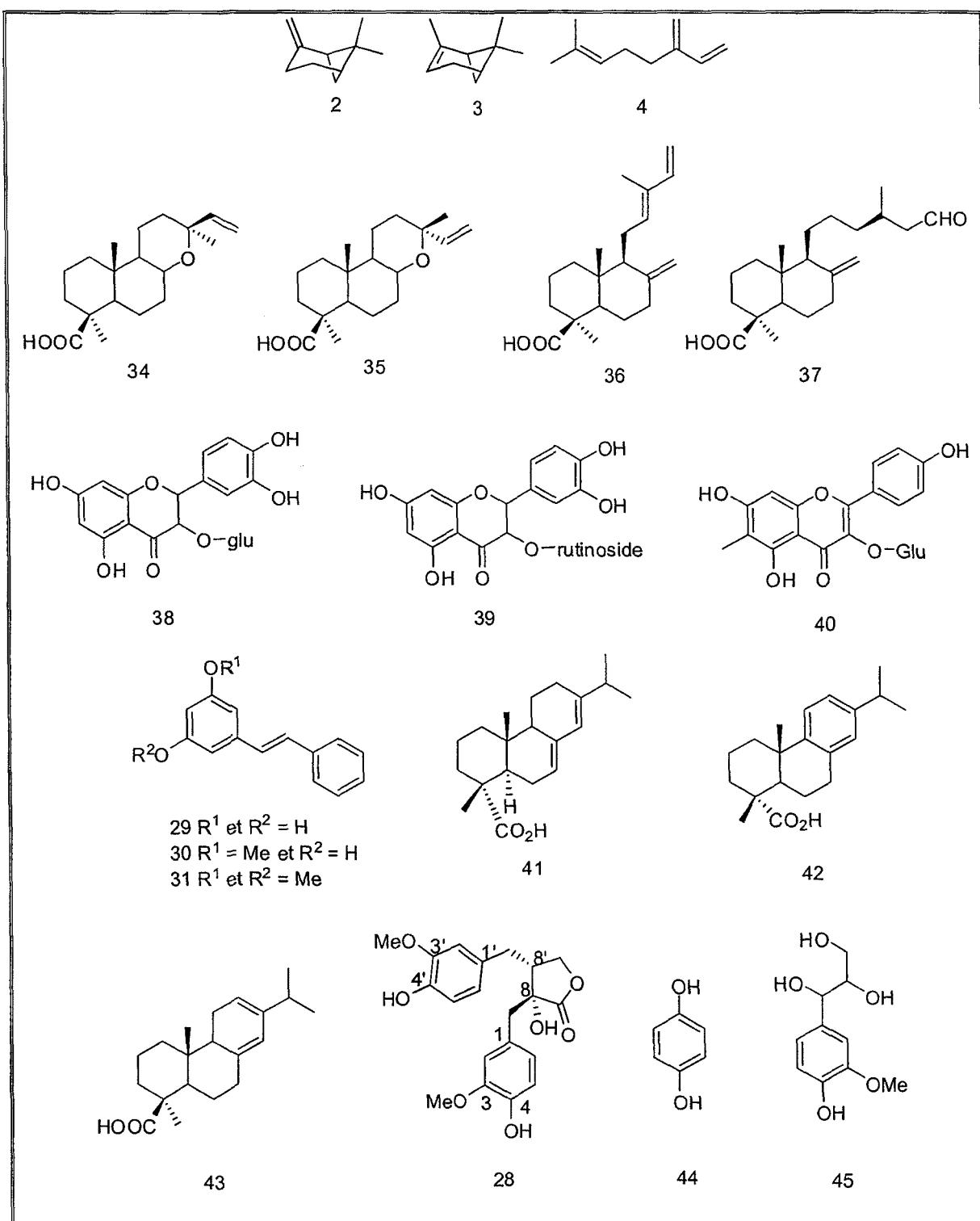


Figure 9 : Produits identifiés dans le pin rouge

2.6 Activité biologique chez le genre *Pinus*

Plusieurs études visant à évaluer le potentiel biopharmaceutique de différentes espèces de pins ont été rapportées dans la littérature. Ces travaux se penchent particulièrement sur le potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique. Il existe aussi quelques études sur le potentiel anticancéreux d'extraits de pins et de composés provenant du genre *Pinus*. Le Pycnogenol est un supplément nutritif commercialisé qui correspond à un extrait éthanolique-aqueux des écorces de *Pinus maritima*. Cet extrait est composé principalement de proanthocyanidines et d'acides phénoliques (Rohdewald, 2002). Il a une toxicité aigüe et chronique faible et les activités biologiques qui lui sont attribuées sont nombreuses : traitement de l'insuffisance veineuse chronique, protection contre le stress oxydatif dans plusieurs systèmes cellulaires, activité antiinflammatoire *in vitro* et *in vivo*, etc. (Rohdewald, 2002). L'induction de l'apoptose par le Pycnogenol a aussi été démontrée sur une lignée de cellules de cancer du sein (MCF-7) ainsi que sur trois lignées cellulaires leucémiques (HL-60, U937 et K562) (Huang *et al*, 2005). Des extraits d'aiguilles, d'écorces et de cônes de *Pinus massoniana* ont montré une faible inhibition de la croissance de cellules leucémiques de type U937 (Cui *et al*, 2005a). Un extrait des écorces de *Pinus massoniana* a aussi montré pouvoir induire l'apoptose sur une lignée de cellules cancéreuses du foie (BEL-7402) (Cui *et al*, 2005b). Certains diterpènes isolés de *Pinus luchuensis* ont été testés pour leur activité chemopréventive face au cancer et ont montré des résultats intéressants (Minami *et al*, 2002). Le triterpène **35** (figure 6, page 14) a montré un faible potentiel anticancéreux en tant qu'inhibiteur de l'ADN topoisomérase II (Wada et Tanaka, 2005).

L'activité antioxydante des extraits de *Pinus contorta* et de *Pinus sibirica* (Willför, *et al*, 2003a), de l'huile essentielle de *Pinus mugo* (Grassmann *et al*, 2003), du Pycnogenol (Packer *et al*, 1999), d'extraits d'écorces de *Pinus pinaster* (Touriño *et al*, 2005), d'extraits d'aiguilles de *Pinus sylvestris* (Ka *et al*, 2005; Vuorela *et al*, 2005), d'extraits d'aiguilles de *Pinus densiflora* (Jung *et al*, 2003), d'extraits de *Pinus morrisonicola* (Hsu *et al*, 2005) et d'extraits de *Pinus massoniana* (Cui *et al*, 2005a) a été démontrée clairement au cours des dix dernières années. La présence de composés phénoliques explique en grande partie ce fort potentiel antioxydant.

Les propriétés antibactérienne et antifongique des pins, attribuable à un grand nombre de phytoalexins, suscitent aussi beaucoup d'attention dans la littérature scientifique. Le tableau 2 présente les composés isolés de pins ou les extraits de pins qui ont montré de l'activité sur des lignées microbiennes.

Tableau 2 : Activités antimicrobiennes recensés chez le genre *Pinus*

Espèce ou composé testé	Souche microbienne utilisée		Activité	Référence	
Acide isopimarique (<i>P. nigra</i>)	<i>staphylococcus aureus</i>	Souches	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Smith <i>et al</i> , 2005	
		XU212 (TetK)	32		
		SA-1199B (NorA)	32		
		RN4220 (MsrA)	64		
		EMRSA-15	32		
		EMRSA-16	64		
		ATCC 25923	64		
<i>Pinus Sylvestris</i>	Zone d'inhibition			Rauha <i>et al</i> , 2000	
	<i>Staphilococcus aureus</i>				
<i>Pinus sylvestris</i>	Zone d'inhibition			Lindberg <i>et al</i> , 2004	
	<i>Bacillus coagulans</i>				
	<i>Burkholderia multivorans</i>				
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>				
<i>Pinus sylvestris</i>	% d'inhibition de la croissance (4 – 100 $\mu\text{g/ml}$)			Vuorela <i>et al</i> , 2005	
	<i>Salmonella typhimurium</i>				
	<i>Proteus mirabilis</i>				
<i>Pinus densiflora</i>	Zone d'inhibition (mm)			Hong <i>et al</i> , 2004	
	<i>S. aureus</i>				
	<i>Listeria monocytogenes</i>				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
<i>Pinus densiflora</i>	% inhibition de la croissance (4,38 $\mu\text{L}/0,5 \text{ ml}$)			Kim <i>et al</i> , 2005	
	<i>Bacillus cereus</i>				
	<i>Salmonella typhinurium</i>				
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				
	<i>Listeria monocytogenes</i>				
	<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Pinus contorta</i>	Croissance microbienne			Ritch-Krc <i>et al</i> , 1996	
	<i>E. coli</i>				
	<i>S. aureus</i>				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Pinus ponderosa</i>	% inhibition de la croissance (2, 5 et 10 %)			Krauze- Baranowska <i>et al</i> , 2002	
	<i>Fusarium culmorum</i>				
	<i>Fusarium poae</i>				
	<i>Fusarium solani</i>				
<i>Pinus strobus</i>	% inhibition de la croissance (2, 5 et 10 %)			Krauze- Baranowska <i>et al</i> , 2002	
	<i>Fusarium culmorum</i>				
	<i>Fusarium poae</i>				
	<i>Fusarium solani</i>				
<i>Pinus koraiensis</i>	Zone d'inhibition (mm)			Hong <i>et al</i> , 2004	
	<i>Candida albicans</i>				
<i>Pinus contorta</i>	Zone d'inhibition			Lindberg <i>et al</i> , 2004	
	<i>Bacillus coagulans</i>				
	<i>Burkholderia multivorans</i>				
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>				
<i>Pinus banksiana</i>	zones d'inhibition			Lindberg <i>et al</i> , 2004	
	<i>Bacillus coagulans</i>				
	<i>Burkholderia multivorans</i>				
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>				
Polymère de proanthocyanidin (<i>Pinus nigra</i>)	% inhibition de la croissance (80 mg/ml)			Eberhardt <i>et al</i> , 1994	
	<i>Ceratocystis coerulescens</i>				
	<i>Schizophyllum commune</i>				

2.7 Activité biologique du pin rouge

Dans la littérature scientifique, très peu d'études s'intéressent à l'évaluation de l'activité biologique de *P. resinosa*. Les quelques études existantes portent principalement sur les activités antifongique et antibactérienne potentielles d'extraits de pin rouge. L'huile essentielle des aiguilles a montré une inhibition de la croissance de trois espèces de champignon du genre *Fusarium* à une concentration de 5% (Krauze-Baranowska *et al*, 2002). Un extrait de nœuds obtenu à l'aide d'un mélange d'acétone et d'eau a fortement inhibé la croissance de la bactérie gram-négative *Burkholderia multivorans* et de la gram-positive *Bacillus coagulans* (Lindberg *et al*, 2004). Les stilbènes **12**, **13** et **14**, (figure 9) présents dans différentes parties du pin rouge, sont bien connus pour leurs activités antifongique et antibactérienne (Hart J.H., 1981). L'activité antioxydante des cônes, de l'écorce et des aiguilles a été évaluée par le test réduction du radical 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DDPH). Les aiguilles et les cônes ont montré le pouvoir antioxydant le plus intéressant (Zulaica-Villagomez *et al*, 2002).

2.8 La recherche de nouveaux composés anticancéreux

La chimiothérapie est de façon générale un traitement médical ayant recours à des substances chimiques. Dans le cas du cancer, on parle surtout de substances chimiques utilisées pour ralentir la croissance et même parfois pour éliminer les cellules cancéreuses. Plusieurs substances sont actuellement utilisées en chimiothérapie et des effets secondaires importants y sont rattachés. Ceci vient du fait que les traitements de chimiothérapie ne sont pas spécifiques aux cellules cancéreuses mais s'attaquent à toutes les cellules en croissance.

C'est pour tenter de palier à ce manque de sélectivité que ce projet a été élaboré. Des travaux préliminaires ont montré qu'un extrait au méthanol de pin rouge était plus毒ique envers les cellules cancéreuses qu'envers les cellules saines. L'identification des composés responsables de cette activité pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux anticancéreux plus sélectifs que ceux qui existent actuellement.

Pour la découverte de nouveaux agents anticancéreux qui pourraient être utilisés en chimiothérapie, les tests *in vitro* sont généralement utilisés en première ligne afin d'évaluer le potentiel d'un extrait, d'une fraction ou d'un composé. C'est une méthode rapide et peu dispendieuse qui permet de tester un grand nombre d'échantillons. Une grande panoplie de cellules cancéreuses est maintenant disponible pour la culture ce qui fait des tests *in vitro*, la méthode de prédilection pour la sélection des espèces de végétaux et pour le fractionnement guidé par la bioactivité dans la recherche de nouveaux anticancéreux d'origine naturelle (Tringali, 2001).

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Ce chapitre présente un article scientifique rédigé pour la revue scientifique *Phytotherapy research* concernant l'isolement de composés anticancéreux de l'extrait MeOH de pin rouge. Il a été accepté et est en attente de publication au moment du dépôt final du mémoire. L'article intégral est d'abord précédé d'un résumé en français.

3.1 Résumé

Un extrait méthanolique de bois de *Pinus resinosa* a démontré être sélectivement cytotoxique contre la lignée cellulaire de carcinome du poumon humain A549 ($IC_{50} : 41 \pm 6 \mu\text{g/ml}$) et la lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal DLD-1 ($IC_{50} : 47 \pm 4 \mu\text{g/ml}$) en comparaison aux cellules saines WS1 ($IC_{50} : 130 \pm 11 \mu\text{g/ml}$). Cinq composés connus ont été isolés et identifiés par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C et par spectroscopie de masse haute résolution (HR-ESI-MS) comme étant le pinosylvin monométhyl éther (1), le pinosylvin (2), le pinosylvin diméthyl éther (3), le pinobanksin (4) et le (-)-nortrachelogenin (5). Le composé 4 a été isolé pour la première fois dans le *P. resinosa*. La cytotoxicité des composés 1 à 5 a été évaluée sur les lignées cellulaires A549, DLD-1 et WS1. Le composé 1 a montré être le plus actif contre les cellules A549, DLD-1 et WS-1 avec des IC_{50} respectives de $5,7 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$, $4,5 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ et $7,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$.

3.2 Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from the Wood of *Pinus resinosa*

Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from the Wood of *Pinus resinosa*

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

Laboratoire LASIEVÉ, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi (Québec), Canada

Methanol extracts of wood from *Pinus resinosa* were found to be selectively cytotoxic against human lung carcinoma cells, A549 (IC_{50} $41 \pm 6 \mu\text{g/mL}$), human colorectal adenocarcinoma cells, DLD-1 (IC_{50} $47 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) in comparison with healthy cells, WS1 (IC_{50} $130 \pm 11 \mu\text{g/mL}$). Five known compounds were isolated and identified by ^1H , ^{13}C NMR spectroscopy and HR-ESI-MS mass spectrometry as, pinosylvin monomethyl ether (1), pinosylvin (2), pinosylvin dimethyl ether (3), pinobanksin (4) and (-)-norachelogenin (5). Compound 4 was isolated for the first time in *P. resinosa*. The cytotoxicity of compounds 1–5 was evaluated against A549, DLD-1 and WS1. Compound 1 exhibited the strongest cytotoxicity against both tumor cell lines and the healthy cell line with an IC_{50} of $25 \pm 4 \mu\text{M}$ for A549, $20 \pm 1 \mu\text{M}$ for DLD-1 and $34 \pm 3 \mu\text{M}$ for WS1.

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Pinus resinosa*; stilbene; bioassay-guided isolation; cytotoxic.

INTRODUCTION

The red pine, *Pinus resinosa* Ait, belonging to the Pinaceae family, is widely distributed in the northeast of the United States and in the south of Canada (Brouillet and Goulet, 1995). *P. resinosa* was used in Native American traditional medicine as a cold remedy, a stimulant and an analgesic (Moermann, 1998). The needle's essential oil is rich in pinene and was found to be active against fungus such as *Fusarium* (Krauze-Baranowska *et al.*, 2002). Moreover, resinic acids and phenolic glycosides were identified in the needle extracts using diethyl ether or ethanol, respectively (Zinkel and Clarke, 1985; Beninger and Abou-Zaid, 1997). Stilbenes such as pinosylvin monomethyl ether (1), pinosylvin (2) and pinosylvin dimethyl ether (3) were identified in the heartwood extracts of *P. resinosa* (Celimene *et al.*, 1999). The stilbenes 1 and 2 were also identified in the hydrophilic extract of knotwood together with resinic acids and lignans (Lindberg *et al.*, 2004). Interestingly, wounding or fungal attack of pine trees induce the synthesis of 1 and 2 (Roupe *et al.*, 2005; Kodan *et al.*, 2002; Chiron *et al.*, 2000). Both compounds demonstrated antifungal and antibacterial activities (Lindberg *et al.*, 2004; Seppänen *et al.*, 2004; Celimene *et al.*, 1999).

In this work, the cytotoxicity of extracts from the wood of *P. resinosa* was evaluated *in vitro* against lung carcinoma cells (A549), colorectal adenocarcinoma cells (DLD-1) and healthy cell lines (WS1). The methanol extract showed a significant and selective cytotoxicity toward A549 and DLD-1 in comparison with WS1. Bioassay-guided isolation of pure compounds was

carried out in order to identify the compound(s) responsible for the activity.

MATERIAL AND METHODS

General. Melting points were determined on a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were obtained on a Jasco DIP-360 digital polarimeter. FTIR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer Spectrum One Instrument. NMR spectra were recorded at 292 K on a Bruker Avance 400 operating at 400.13 MHz for ^1H and 100.61 for ^{13}C and using a 5 mm QNP probe with a z-gradient coil. Resveratrol was purchased from Sigma-Aldrich, Canada. Reagent grade chloroform and methanol were distilled prior to utilization and reagent grade hexane and ethyl acetate were used without further purification for the extraction and separation of compounds 1–5. The adsorbents for open glass column chromatography were silica gel Ultra Pure (40–63 μm , Silicycle, Québec, Canada) and C_{18} reversed phase silica gel Ultra Pure (carbon 11%, 40–63 μm , Silicycle, Québec, Canada). TLC was performed on silica gel 60 F_{254} glass plates (250 μm layer thickness, Silicycle, Québec, Canada). Reversed phase TLC was carried out on Merck RP-18 F_{254} glass plates. The TLC plates were sprayed with 5% H_2SO_4 followed by 1% vanillin in ethanol and heated at 110 °C for 5 min. TLC spots were visualized by inspection of the plates under visible light (Wagner *et al.*, 1984).

Plant material. The trunks of *Pinus resinosa* Ait. (coming from four different trees) were collected in May 2004 near La Baie, Québec, Canada (48°19'03" N, 71°01'26" E) and authenticated by Mr Patrick Nadeau (Fundamental Sciences Department, Université du Québec à Chicoutimi). A voucher specimen (No. 0493197) has been deposited in the herbarium Louis-Marie of Laval University, Québec, Canada.

* Correspondence to: Professor André Pichette, Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boulevard de l'Université, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1.

E-mail: andre_pichette@uqac.ca

Contract/grant sponsor: Action Concertée FQRNT – Fonds de la recherche forestière du Saguenay – Lac-Saint-Jean.

Extraction and isolation. The air-dried (1 week) powdered wood from *P. resinosa* (9.2 kg) was successively extracted with hexane, dichloromethane, methanol and water using a Soxhlet apparatus (5 L each for 24 h). Evaporation under reduced pressure at a temperature not higher than 45 °C yielded a methanol extract (101 g) and a water extract (38 g).

Part of the methanol extract from *P. resinosa* (71 g) was partitioned between ethyl acetate and water. The EtOAc-soluble extract (20 g) gave 15 fractions by open column chromatography on silica gel with a CHCl₃-MeOH gradient (100:0 → 0:100). Fraction 3 (285.9 mg) was subjected to reversed-phase column chromatography using MeOH-H₂O 7:3 as eluent to give pure **1** (114.6 mg). Further silica gel column chromatography of fraction 8 (689 mg) eluted with a hexane-EtOAc gradient (90:10 → 40:60) afforded compound **4** (31 mg) and impure **5**. This compound was purified on reversed-phase column chromatography (MeOH-H₂O, 6:4) to give pure **5** (100 mg). Fraction 10 was separated by open column chromatography on silica gel with a hexane-EtOAc gradient (20:80 → 70:30) to give pure **2** (525.5 mg).

To isolate known compound **3**, the hexane extract (310 g) was defatted as described by Barrero *et al.* (1991). Part of the defatted hexane extract (100 g) was fractionated by open column chromatography on silica gel with a CHCl₃-MeOH gradient (100:0 → 0:100) to give seven fractions. Compound **3** (13 mg) was obtained from open column chromatography of fraction 2 (31.8 g) using a hexane-EtOAc gradient (98:2 → 60:40).

Pinosylvin monomethyl ether (1): Yellowish powder, mp 118–121 °C; *R*_f = 0.65 (SiO₂, CHCl₃-MeOH 80:1); HR-ESI-MS (positive) *m/z* = 226.0994 (C₁₅H₁₄O₂, [M]⁺, requires 226.0994). IR, ¹H and ¹³C NMR data were similar to published values (Ngo *et al.*, 1998).

Pinosylvin (2): Yellowish powder, mp 153–154 °C; *R*_f = 0.27 (SiO₂, CHCl₃-MeOH 40:1); HR-ESI-MS (positive) *m/z* = 212.0832 (C₁₄H₁₂O₂, [M]⁺, requires 212.0837). IR, ¹H and ¹³C NMR data were similar to published values (Ngo and Brown, 1998).

Pinosylvin dimethyl ether (3): Amorphous solid, *R*_f = 0.36 (SiO₂, Hex-EtOAc 97:3); HR-ESI-MS (positive) *m/z* = 240.1152 (C₁₆H₁₆O₂, [M]⁺, requires 240.1150). IR, ¹H and ¹³C NMR data were similar to published values (Ngo and Brown, 1998).

Pinobanksin (4): Yellow solid, mp 164–166 °C; $[\alpha]_D^{25} = +10.1$ (*c* = 0.5, acetone); *R*_f = 0.29 (SiO₂, CHCl₃-MeOH 80:1); HR-ESI-MS (positive) *m/z* = 272.0681 (C₁₅H₁₂O₃, [M]⁺, requires 272.0685). IR, ¹H and ¹³C NMR data were similar to published values (Kuroyanagi *et al.*, 1982).

(-)-Nortrachelogenin (5): Amorphous solid, $[\alpha]_D^{25} = -38.3$ (*c* = 0.5, acetone); *R*_f = 0.27 (SiO₂, CHCl₃-MeOH 80:1); HR-ESI-MS (positive) *m/z* = 374.1365 (C₂₀H₂₂O₂, [M]⁺, required 374.1366). IR, ¹H and ¹³C NMR data were similar to published values (Sefkow, 2001).

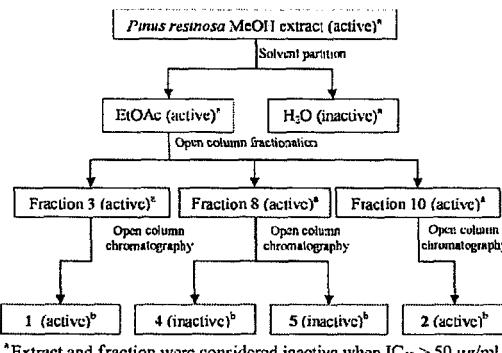
Cell culture. The following human cell lines were used for this study: A549 (lung carcinoma), DLD-1 (colorectal adenocarcinoma) and WS1 (normal skin fibroblast). All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The A549, DLD-1 and WS1 cell lines were grown in minimum essential medium with Earle's salts. Medium was supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine (1X), solution of vitamins (1X), sodium

pyruvate (1X), non-essential amino acids (1X), penicillin (100 IU) and streptomycin (100 µg/mL). The cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO₂.

Cytotoxicity assay. Exponentially growing cells were plated at a density of 5×10^3 cells per well in 96-well microplates in 100 µL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Then, 100 µL of increasing concentrations of extract or pure compounds dissolved in the appropriate solvent were added. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. The cells were incubated for 48 h in the absence or in the presence of extract. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test as described by O'Brien (O'Brien *et al.*, 2000). Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration of extract or compound inhibiting cell growth by 50% (IC₅₀).

RESULTS AND DISCUSSION

Lipophilic compounds (5.2%) were removed from plant material using hexane followed by DCM extractions. The extraction yield obtained with DCM was low suggesting that lipophilic compounds were efficiently extracted by hexane. Then, the biomass was extracted again with MeOH and water with a yield of about 1.1% and 0.4%, respectively. The cytotoxicity of the MeOH and the aqueous extracts were tested against human lung carcinoma (A549), human colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and normal fibroblasts (WS1). The results presented in Table 1 show that the MeOH extract is moderately cytotoxic against A549 (IC₅₀ 41 ± 6 µg/mL) but significantly selective toward cancer cells in comparison with healthy cells, WS1 (IC₅₀ 130 ± 11 µg/mL). Similar cytotoxicity of the ethanol extract from knotwood of *Pinus resinosa* was previously reported against murine hepatic cell line, Hepa-1 (Välimaa *et al.*, 2007). The water extract did not show cytotoxicity against A549, DLD-1 and WS1 at 100 µg/mL. As illustrated in Fig. 1, the pure cytotoxic compounds



*Extract and fraction were considered inactive when IC₅₀ > 50 µg/ml.
^aA pure compound was considered inactive when IC₅₀ > 20 µg/ml.

Figure 1. Bioassay-guided isolation of compounds **1**, **2**, **4** and **5**.

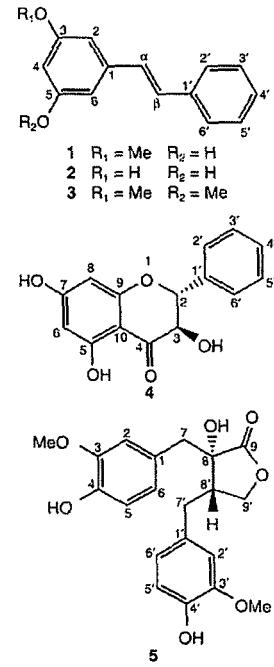
CYTOTOXIC COMPOUNDS FROM *PINUS RESINOSA*Table 1. Cytotoxic activity (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$ for extract and fractions, μM for pure compounds)^a of isolates from heartwood of *Pinus resinosa*

Compound	Cell line		
	A549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d
MeOH extract	41 ± 6	47 ± 4	130 ± 11 ^f
EtOAc	11 ± 1	19 ± 3	47 ± 7
H ₂ O	>100 ^f	>100 ^f	>100 ^f
Fraction 3	6.2 ± 0.3	6.6 ± 0.2	13.1 ± 0.6
Fraction 8	5.7 ± 0.6	16 ± 3	12 ± 6
Fraction 10	3.9 ± 0.1	6.8 ± 0.4	6.6 ± 0.6
Pinosylvin monomethyl ether (1)	25 ± 4	20 ± 1	34 ± 3
Pinosylvin (2)	66 ± 10	75 ± 14	69 ± 13
Pinosylvin dimethyl ether (3)	>100 ^g	>100 ^g	>100 ^g
Pinobanksin (4)	>100 ^g	>100 ^g	>100 ^g
(-)-Nortrachelogenin (5)	74 ± 38	>200	>200
Resveratrol ^e	24 ± 3	30 ± 6	51 ± 7
Etoposide ^g	1.0 ± 0.3	4 ± 1	nd

^a Concentration inhibiting 50% of cell growth.^b A549, human lung carcinoma cell line.^c DLD-1, human colorectal adenocarcinoma cell line.^d WS1, human normal skin fibroblasts.^e Positive control.^f An extract or fraction was considered inactive when IC_{50} is over than 100 $\mu\text{g/mL}$ (Boyd, 1997).^g A pure compound was considered inactive when IC_{50} is over than 100 μM (Boyd, 1997).

were isolated using a bioassay-guided strategy. Solvent partition of the methanol extract resulted in the localization of the active and selective components in the ethyl acetate fraction with IC_{50} values of $11 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ for A549, $19 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ for DLD-1 and $47 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ for WS1. The ethyl acetate fraction was subjected to column chromatography over silica gel. Fifteen pooled fractions were obtained and tested for cytotoxicity against A549, DLD-1 and WS1 (Fig. 1). Three fractions (3, 8 and 10) were found significantly active against A549 and DLD-1 with IC_{50} ranging from 3.9 ± 0.1 to $6.8 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$, but only fraction 3 was found selective toward cancer cells in comparison with normal cells, WS1 ($13.1 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$). After further purification by column chromatography, compounds **1** and **2** were respectively isolated from fractions 3 and 10, while compounds **4** and **5** were obtained from fraction 8. Compound **3** was purified by column chromatography from the defatted hexane extract. The structures, presented in Fig. 2, of compounds **1**–**5** were characterized by IR, ¹H, ¹³C NMR spectroscopy and HR-ESI-MS mass spectrometry as pinosylvin monomethyl ether (**1**), pinosylvin (**2**), pinosylvin dimethyl ether (**3**), pinobanksin (**4**) and (-)-nortrachelogenin (**5**). Spectroscopic data of compounds **1**–**5** were in agreement with the values reported in the literature (Ngo and Brown, 1998; Kuroyanagi *et al.*, 1982; Sefkow, 2001). All compounds had already been identified in the wood or knotwood from *P. resinosa* except compound **4** (Celimene *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2004).

The cytotoxicity of isolated compounds **1**–**5** was evaluated against A549, DLD-1 and WS1. Etoposide and resveratrol were used as positive controls. The results presented in Table 1 show that compounds **3** and **4** were inactive ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$), while compound **2** was weakly cytotoxic against A549 and DLD-1 and also against WS1 with IC_{50} values ranging from 66 ± 10 to $75 \pm 14 \mu\text{M}$. Compound **5** was weakly cytotoxic against

Figure 2. Structures of compounds **1**–**5**.

A549 ($IC_{50} 74 \pm 38 \mu\text{M}$) but inactive against DLD-1 and WS1 ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Altogether, these results indicate that compound **2** (fraction 10) and compounds **4** and **5** (fraction 8) do not explain the cytotoxicity of the corresponding fractions. Therefore, these results suggest that other compounds are responsible for their activity.

Finally, compound **1** was found to be moderately cytotoxic against both tumor cell lines and healthy cells with IC_{50} of $25 \pm 4 \mu\text{M}$ for A549, $20 \pm 1 \mu\text{M}$ for DLD-1 and $34 \pm 3 \mu\text{M}$ for WS1. Recently, Välimäa reported the cytotoxicity of compounds **1** and **2** against murine Hepa-1 cells with IC_{50} of more than $100 \mu\text{M}$. To our knowledge, significant cytotoxicity against human tumor cell lines of compound **1** has never been reported previously. The activity of compound **1** was lower in comparison with etoposide but similar to resveratrol, a stilbene known to inhibit lung and colorectal cancer *in vitro* (Aggarwal *et al.*, 2004). This result suggests that compound **1** is responsible, in part, for the cytotoxicity of fraction 3. However, in contrast to fraction 3, compound **1** was not found to be selective toward both tumor cell lines.

This work reports the cytotoxicity of the methanol extract from the wood of *P. resinosa* and the isolation and characterization of five known compounds. All the compounds were already identified in this species except for compound **4**. Compound **1** was found to be moderately active against all cell lines tested, A549, DLD-1 and WS1.

Acknowledgements

The authors are grateful to P. Nadeau for plant identification. We thank Dr N. Voyer from Laval University for optical rotation measurements. We thank B. Keller for HR-ESI-MS measurements. FS thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for a scholarship. This work was supported by Action Concertée FQRNT – Fonds de la recherche forestière du Saguenay – Lac-Saint-Jean.

REFERENCES

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24: 2783–2840.
- Barbero AF, Herrador MM, Arteaga P. 1991. Sesquiterpenes and phenylpropanoids from *Seseli vayredanum*. *Phytochemistry* 31: 203–207.
- Beninger CW, Abou-Zaid MM. 1997. Flavonol glycosides from four pine species that inhibit early instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymnatriidae) development. *Biochem Syst Ecol* 25: 505–512.
- Boyd MR. 1997. In *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*, Teicher BA (ed.). Humana Press: Totowa, NJ, 23–42.
- Brouillet L, Goulet I. 1995. *Flora Laurentienne*, 3rd edn. Les Presses de l'Université de Montréal: Montréal.
- Celimene CC, Micales JA, Ferge L, Young RA. 1999. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* 53: 491–497.
- Chiron H, Drouet A, Lieutier F, Payer HD, Ernst D, Sandermann JH. 2000. Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection. *Plant Physiol* 124: 865–872.
- Kodan A, Duroda H, Sakai F. 2002. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3335–3339.
- Krauze-Baranowska M, Mardarowicz M, Wiwart M, Poblocka L, Dynowska M. 2002. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. *Z Naturforsch* 57: 478–482.
- Kuroyanagi M, Yamamoto Y, Fukushima S, Ueno A, Noro T, Miyase T. 1982. Chemical studies on the constituents of *Polygonum nodosum*. *Chem Pharm Bull* 30: 1602–1608.
- Lindberg LE, Willför SM, Holmbom BR. 2004. Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 137–147.
- Moermann DE. 1998. *Native American Ethnobotany*. Timbre Press: Portland OR.
- Ngo KS, Brown GD. 1998. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry* 47: 1117–1123.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421–5426.
- Roupe K, Halls S, Davies NM. 2005. Determination and assay validation of pinosylvin in rat serum application to drug metabolism and pharmacokinetics. *J Pharm Biomed Anal* 38: 148–154.
- Sefkow M. 2001. Enantioselective synthesis of (-)-wikstromol using a new approach via malic acid. *J Org Chem* 66: 2343–2349.
- Seppänen SK, Syrjälä L, von Weissenberg K, Teeri TH, Paajanen L, Pappinen A. 2004. Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep* 22: 584–593.
- Välimäa AL, Honkalampi-Hämäläinen U, Pietarinen S, Willför S, Holmbom B, von Wright A. 2007. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated micro-organisms. *Int J Food Microbiol* 115: 235–243.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.
- Zinkel DF, Clarke WB. 1985. Resin acids of *Pinus resinosa* needles. *Phytochemistry* 24: 1267–1271.

CHAPITRE IV
AVANCEMENT DES TRAVAUX

Ce chapitre est consacré aux travaux effectués au cours de ce projet mais qui ne font pas partie de l'article scientifique présenté au chapitre 3. Un criblage basé sur l'activité anticancéreuse avait été effectué en début de projet sur quatre espèces de conifères de la forêt boréale dans le but de sélectionner celle possédant le meilleur potentiel. La méthode utilisée pour ce criblage est présentée à la section 4.1.1 et les résultats à la section 4.2.1. Les travaux qui sont présentés ensuite portent sur le fractionnement, l'évaluation de l'activité anticancéreuse et sur une étude préliminaire de la composition chimique par GC-MS de l'extrait à l'hexane de pin rouge (matériels et méthode à la section 4.1.2 et les résultats à la section 4.2.3). Enfin, les autres activités biologiques évaluées sur les molécules identifiées au cours du projet sont présentées aux sections 4.1.3 (matériel et méthodes) et 4.2.4 (résultats).

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Extractions de bois de conifères

Cette partie des travaux, réalisée en début de projet, a été effectuée afin de sélectionner l'espèce végétale faisant l'objet de travaux d'isolement guidé par la bioactivité. Il s'agit d'un criblage effectué sur quelques espèces de conifères pour évaluer le potentiel anticancéreux des produits naturels de leur bois.

4.1.1.1 Méthode d'extraction

Les espèces qui ont fait partie du criblage sont le pin blanc (*Pinus strobus*), le pin gris (*Pinus banksiana*), le pin rouge (*Pinus resinosa*) et le cèdre (*Thuja occidentalis*). Toutes les extractions ont été effectuées à l'aide d'un montage de type Soxhlet. Environ

125 g de bois broyé étaient déposé dans une cartouche de cellulose à double épaisseur de 60 mm de diamètre par 180 mm de hauteur. Les solvants d'extraction, l'hexane, le dichlorométhane (DCM), le MeOH et l'eau, ont été utilisés de façon successive. Pour chacun des solvants, un volume de 600 ml était utilisé pour une durée d'extraction de 24 heures.

4.1.2 Travaux de fractionnement et d'isolement effectués sur l'extrait hexane de pin rouge

4.1.2.1 Fractionnement de l'extrait à l'hexane de pin rouge

L'activité anticancéreuse de l'extrait à l'hexane de pin rouge n'a pas été évaluée lors des tests préliminaires en raison de sa faible solubilité. Cet extrait a donc été soumis à un procédé de dégraissage, effectué selon la procédure de Barrero *et al.* (Barrero *et al.*, 1992), permettant d'éliminer la majorité des cires, des glycérides et des acides gras présents dans l'extrait. Un fractionnement grossier sur colonne de gel de silice (1 kg, diamètre de 8,8 cm et hauteur de 27 cm de gel de silice) a ensuite été effectué à partir de 100 g d'extrait de pin rouge dégraissé en utilisant comme éluant du CHCl₃, un mélange 40:1 CHCl₃-MeOH et du MeOH. Des fractions de 500 ml ont été récoltées puis analysées par CCM en utilisant comme éluant un mélange CHCl₃:MeOH (80 :1 et 40 :1) et en révélant avec l'acide sulfurique et la vanilline (Wagner *et al.* 1984). Les fractions ayant des tâches de R_f identiques ont été combinées pour obtenir en finalité 7 fractions principale (figure 11, page 56). Ces fractions, nommées PRHex 1 à PRHex 7, ont été soumises aux tests d'activité anticancéreuse en utilisant le protocole décrit au chapitre 3.

4.1.2.2 Travaux de purification effectués sur la fraction PRHex2 de l'extrait hexane de bois de pin rouge

La purification a été réalisée sur une colonne ouverte de gel de silice (800 g) de 6,5 cm de diamètre et de 48 cm de haut. L'élution a été effectuée en gradient par palier avec des mélanges 98:2, 96:4, 90:10, 80:20, 70:30 et 60:40 hexane-EtOAc puis la colonne a été lavée avec du MeOH. Les fractions récoltées ont été déposées sur des plaques CCM (milieux d'élutions : 98:2 Hexanes-EtOAc et 80:1 CHCl₃-MeOH, révélateur : H₂SO₄-vanilline) et celles qui étaient identiques ont été combinées. Cette séparation a permis d'obtenir 7 fractions distinctes nommées PRHex 2.1 à PRHex 2.7. La fraction PRHex 2.1 (557,9 mg) a été chromatographiée sur colonne ouverte en éluant de façon isocratique avec 98:2 hexanes-EtOAc ce qui a permis d'obtenir 5 fractions nommées PRHex2.1.a à PRHex2.1.e. Le pinosylvin dimethyl ether était le composé majoritaire de la fraction PRHex 2.1.b. Il a ainsi pu être testé avec les deux autres stilbènes isolés de l'extrait MeOH sur les lignées de cellules cancéreuses (A549, DLD-1) et sur la lignée de cellules saines (WS1). Les autres fractions ont été obtenues en faible quantité et montraient une composition assez complexe par CCM. De plus, la chromatographie sur couche mince de la fraction PRHex 2.2 (5,5508 g) était très semblable à celles des fractions PRHex 2.1.c à PRHex 2.1.e. La fraction PRHex 2.2 a donc été soumise à un fractionnement sur colonne ouverte. La colonne utilisée avait une hauteur de 36 cm, un diamètre de 6 cm et contenait 550 g de gel de silice. L'élution a été effectuée avec un gradient par étape en utilisant comme éluant des mélanges d'hexane et d'EtOAc (97,5:2,5, 96,5:3,5, 93:7, 90:10, 85:15 et EtOAc pur). Les fractions semblables (selon CCM) ont été combinées ce qui a mené à

l'obtention de 14 fractions nommées PRHex 2.2.a à PRHex 2.2.n. La fraction PRHex 2.2.f a été purifiée par chromatographie éclaire sur 55 g de gel de silice (2 cm x 53 cm). Le gradient qui a été utilisé était constitué des mélanges hexane-EtOAc dans les ratios 99:1, 98:2 et 97:3.

4.1.2.3 Analyse par GC/MS des fractions obtenues de la purification de l'extrait hexanes

Les fractions PRHex 1 à 7 (excepté 2) ainsi que 2.1 à 2.7 ont été analysées par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les fractions ont d'abord été soumises à une procédure de méthylation des fonctions acides carboxyliques utilisant le diazométhane (procédure complète, 4.1.2.4). La méthode utilisée pour la chromatographie gazeuse ainsi que les paramètres utilisés pour le spectromètre de masse sont présentés au tableau 3.

Tableau 3 : Conditions expérimentales utilisées en GC/MS

Chromatographe : Agilent 6890N (injecteur Agilent 7683)	
Colonne : DB-5MS de J&W Scientific	
Longueur : 30 m	
Diamètre interne : 0,25 mm	
Film : 0,25 µm	
Serial N. : US5105491H	
Volume d'injection : 3µl	
DéTECTEUR : MS quadrupole Agilent 5973	
Ionisation : EI, 70 eV	
T° Injecteur	250 °C
T° DéTECTEUR	280 °C
T° Colonne initiale	100 °C (2 min)
T° Colonne gradient	3 °C/min
T° Colonne finale	280 °C (10 min)

4.1.2.4 Procédure de méthylation des fonctions acides carboxyliques avec le diazométhane

Une solution contenant environ 200 mg de diazald (N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide) dans 5 ml d'éther diéthylique est combinée dans une éprouvette à 5 ml d'une solution aqueuse de 50 % d'hydroxyde de sodium. L'éprouvette est fermée hermétiquement et reliée par un tuyau à une autre éprouvette contenant quelques ml de DCM. Environ 2 ml de MeOH sont ajoutés goutte à goutte dans l'éprouvette contenant le diazald pour permettre le mélange des deux phases. Le diazald réagit alors avec le NaOH pour former le diazométhane qui est un gaz. Un jet d'azote dirigé dans la solution de diazald vient alors pousser le diazométhane vers l'éprouvette contenant le dichlorométhane. Le gaz se solubilise dans le DCM et cette solution est par la suite utilisée pour dérivatiser les composés sensibles envers le diazométhane et dissoudre du même coup les échantillons à analyser par GC/MS. Les fonctions acides carboxyliques réagissent immédiatement avec le diazométhane pour former des esters.

4.1.2.5 Protocole de saponification et d'esterification pour l'analyse des acides gras d'un glycéride

Ce protocole est basé sur une méthode développée par Morrison et Smith (Morrison et Smith, 1964). L'échantillon (50 mg) est mis dans une éprouvette de 50 ml puis un volume de 3 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 0,5 N est ajouté. L'éprouvette est chauffée à 60 °C dans un bain-marie jusqu'à ce que la solution devienne homogène. Par la suite, un volume de 5 ml d'une solution de BF_3 dans le MeOH 14 % est ajouté puis le mélange est portée à ébullition pendant 3 minutes. La solution est ensuite

transférée dans une ampoule à extraction contenant 20 ml d'hexane et 20 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est récoltée et la phase aqueuse est extraite à nouveau avec 20 ml d'hexane. Les deux phases organiques sont combinées, séchées avec du MgSO₄ puis filtrées par gravité sur un papier filtre Whatman #4. Le volume de la phase organique filtrée est complété à 100 ml et la solution résultante est injectée sur GC/MS.

4.1.3 Autres activités biologiques des composés isolés

Bien que l'étude sur *Pinus resinosa* ait été guidée par l'activité anticancéreuse, les molécules isolées lors ces travaux ont été soumises à d'autres tests de bioactivité.

4.1.3.1 Évaluation des activités antibactérienne et antifongique

L'activité antibactérienne a été évaluée à l'aide d'une souche de bactérie gram-négative, *Escherichia coli*, ainsi que d'une souche gram-positive, *Staphylococcus aureus*. La méthode utilisée est celle décrite par Banfi *et al.* (2003) avec quelques modifications. Les bactéries en croissance exponentielle ont été ensemencées dans des plaques (96 trous) à des densités de 5×10^3 par trou pour *E. coli* et de 45×10^3 par trou pour *S. aureus* dans 50 µl de milieu nutritif. Des solutions dans le MeOH de concentrations croissantes des composés à tester ont ensuite été ajoutées. Un volume de 50 µl d'une solution 4 % de rézasurine a été ajouté à chacun des trous et la microplaques a été incubée pendant 6 heures à 37 °C. La fluorescence a été mesurée après 6 heures avec un lecteur de plaque Fluoroskan Accent Fl™ en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La « minimal inhibitory concentration » (MIC 80) est la plus

faible concentration testée pour laquelle au moins 80 % d'inhibition de croissance a été observée. Pour l'évaluation de l'activité antifongique, la même méthode a été utilisée avec la souche de levure *Candida albicans*. La Chloramphénicol a été utilisé comme témoin positif pour l'activité antibactérienne et l'amphotericin B pour l'activité antifongique.

4.1.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet de déterminer la capacité d'un extrait ou d'une molécule à inhiber l'oxydation d'une sonde fluorescente, la fluorescéine. La fluorescéine n'est plus fluorescente une fois oxydée. Les tests ont été effectués sur un lecteur de plaques Fluoroskan Accent FITM et le trolox a été utilisé comme contrôle positif. Les expériences se sont déroulées à 37,5 ° C et à un pH de 7,4. Des mesures de fluorescence ont été enregistrées à toutes les 30 secondes après l'ajout du 2,2-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) qui est l'oxydant. Les résultats finaux sont calculés en comparant les aires sous les courbes de diminution de la fluorescence entre le blanc et les échantillons testés. Ces résultats sont exprimés en micromoles d'équivalent de Trolox (TE) par milligramme ($\mu\text{mol TE/mg}$). Cette méthode est tirée des travaux de Ou *et al* en 2001 avec quelques modifications.

L'évaluation de l'activité antioxydante sur cellules a été effectuée selon la méthode décrite par Legault *et al* en 2003 avec quelques modifications. Des plaques 96 trous ont été ensemencées avec 10 000 cellules L-929 par trou et incubées pendant 24 heures à 37 °C en présence de 5 % de CO₂. Les cellules ont été lavées avec une solution de sel (Hank's balanced salt solution, HBSS) à un pH de 7,4 puis incubées pendant 30 minutes avec 110 μl de HBSS contenant 5 μM de 2',7'-dichlorofluorescin-diacétate (DCFH-DA), un

fluorochrome qui permet de détecter l’oxydation intracellulaire. Les cellules ont ensuite de nouveau été lavées avec 150 µl de HBSS. Pour obtenir l’activité antioxydante, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes des composés testés en présence ou en absence de tert-butylhydroperoxyde (tBH). La fluorescence a été mesurée après 1 h et 4 h sur le lecteur de plaques Fluoroskan Accent FITM. Le Trolox a été utilisé comme témoin positif.

4.2 Résultats

4.2.1 Rendements et activités anticancéreuses des extraits de conifères

Pour sélectionner l’extract méthanolique de pin rouge, un criblage biologique (activité anticancéreuse) avait d’abord été effectué sur quatre conifères de la forêt boréale : le cèdre (*Thuja occidentalis*), le pin gris (*Pinus banksiana*), le pin rouge (*Pinus resinosa*) et le pin blanc (*Pinus strobus*). Les extraits de ces conifères ont été effectués de façon successive avec quatre solvants de polarité croissante (Hexane, DCM, MeOH, EAU). L’inhibition de 50 % de la croissance cellulaire de ces extraits a ensuite été évaluée *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses et une lignée de cellules saines.

Tous les rendements d’extractions sont exprimés en pourcentage de la masse d’extract obtenue par rapport à la masse de marc séché (masse de matériel végétal sec après l’extraction). Tel que le montre le tableau 4, les meilleurs rendements ont été obtenus avec l’hexane dans le cas des trois espèces de pin et avec le MeOH pour le cèdre.

Tableau 4 : Rendements d'extractions du bois de quatre conifères

Espèces	Rendements selon les solvants d'extraction (%)			
	Hexane	DCM	MeOH	EAU
<i>Thuja Occidentalis</i>	1,87	0,81	3,92	0,29
<i>Pinus Banksiana</i>	2,50	1,05	1,22	0,39
<i>Pinus Resinosa</i>	5,20	0,25	1,10	0,41
<i>Pinus strobus</i>	6,90	1,00	2,20	0,41

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anticancéreuse est présentée dans l'article scientifique du chapitre 3 et les résultats pour les extraits de bois de conifères sont présentés au tableau 5. L'extrait ayant montré la cytotoxicité la plus élevée sur les cellules cancéreuses est l'extrait au DCM de *T. occidentalis* avec une IC_{50} de $6,1 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ sur la lignée DLD-1. Cet extract montrait cependant une toxicité équivalente sur les cellules saines avec une IC_{50} de $5,4 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$. Les extraits de pins obtenus avec le DCM sont ceux qui ont retenu notre attention puisqu'ils ont montré une cytotoxicité sélective envers les cellules cancéreuses. C'est dans le cas du pin rouge que les meilleurs résultats sont obtenus avec des IC_{50} de $19 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ sur A549, $26 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ sur DLD-1 et de $53 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ sur WS1. Le rendement de cet extract était cependant faible (0,25 %) et le résultat de plusieurs extractions successives a été gâché par une manipulation malencontreuse. L'extrait n'étant plus disponible, c'est l'extrait MeOH, qui montrait aussi une cytotoxicité sélective sur les cellules cancéreuses, qui a été utilisé pour les travaux de fractionnement guidé par l'activité anticancéreuse. L'activité anticancéreuse de l'extrait à l'hexane de pin rouge n'a pu être évaluée à cause de sa faible solubilité dans le milieu de culture. Cet extract a ensuite été dégraissé et fractionné pour tenter d'éliminer les composés qui nuisaient à la solubilisation. Ces travaux sont présentés à la section 4.1.2 et les résultats à la section 4.2.3.

Tableau 5 : Concentration des extraits inhibant 50 % (IC₅₀) de la croissance cellulaire

Conifère	Solvant d'extraction	IC ₅₀ , lignée cellulaires (µg/ml)		
		A549 (cancéreuse)	DLD-1 (cancéreuse)	WS1 (saine)
<i>Pinus strobus</i>	Hexane	116 ± 9	123 ± 6	138 ± 5
<i>Pinus strobus</i>	Dichlorométhane	38 ± 3	49 ± 5	71 ± 3
<i>Pinus strobus</i>	Méthanol	-	-	398 ± 10
<i>Pinus strobus</i>	Eau	-	143 ± 7	193 ± 12
<i>Thuja occidentalis</i>	Hexane	96 ± 9	46 ± 3	23 ± 2
<i>Thuja occidentalis</i>	Dichlorométhane	27 ± 2	6,1 ± 0,7	5,4 ± 0,8
<i>Thuja occidentalis</i>	Méthanol	84 ± 7	26 ± 2	32 ± 4
<i>Thuja occidentalis</i>	Eau	-	-	-
<i>Pinus banksiana</i>	Hexane	84 ± 6	97 ± 4	110 ± 7
<i>Pinus banksiana</i>	Dichlorométhane	24 ± 2	28 ± 2	56 ± 3
<i>Pinus banksiana</i>	Méthanol	62 ± 5	60 ± 3	88 ± 3
<i>Pinus banksiana</i>	Eau	-	143 ± 7	193 ± 12
<i>Pinus resinosa</i>	Hexane	-	-	-
<i>Pinus resinosa</i>	Dichlorométhane	19 ± 3	26 ± 3	53 ± 5
<i>Pinus resinosa</i>	Méthanol	41 ± 6	47 ± 4	130 ± 11
<i>Pinus resinosa</i>	Eau	-	230 ± 10	-

4.2.2 Fractionnement et identification des composés responsables de l'activité anticancéreuse de l'extrait MeOH de pin rouge

L'article scientifique présenté au chapitre 3 porte sur ces travaux, qui constituent la majeure partie des résultats obtenus. Comme ils y sont déjà décrits en détail, en voici seulement un bref résumé.

L'extrait méthanolique de pin rouge a d'abord été fractionné par extraction liquide-liquide avec de l'eau (H₂O) et de l'acétate d'éthyle (EtOAc). Une forte activité anticancéreuse sélective a été observée avec la fraction EtOAc alors que la fraction aqueuse n'a pas montré de cytotoxicité notable (tableau 6). La fraction soluble dans l'EtOAc a par la suite été purifiée sur colonne ouverte de gel de silice en utilisant un gradient de solvant

(chloroforme (CHCl_3)-MeOH) comme éluant. Ce fractionnement a permis d'obtenir 15 fractions distinctes pour lesquelles les activités anticancéreuses ont été évaluées (tableau 6). Les fractions 3, 8 et 10 sont celles qui ont montré les meilleures activités. Elles ont donc été soumises à des purifications subséquentes. La fraction 3 a permis d'isoler le pinosylvin monométhyl ether (30) qui est en partie responsable de l'activité anticancéreuse de l'extrait MeOH de pin rouge. Les travaux sur la fraction 10 ont mené à l'isolement du pinosylvin (29) qui a montré une activité anticancéreuse plus faible et sans sélectivité par rapport aux cellules saines. Enfin, la fraction 8 contenait principalement le pinobanksin (45) (figure 10) et le (-)-nortrachelogenin (28), deux composés qui n'ont pas montré d'activité anticancéreuse *in vitro* sur les lignées cellulaires aux concentrations testées.

Tableau 6 : Activité cytotoxique de la phase aqueuse et de la phase EtOAc ainsi que des fractions de cette dernière

Fraction	IC ₅₀ [µg/ml]		
	A549	DLD-1	WS1
EtOAc	11 ± 1	19 ± 3	47 ± 7
EAU	> 200	> 200	> 200
2	10 ± 1	12,4 ± 0,8	20 ± 2
3	6,2 ± 0,3	6,6 ± 0,2	13,1 ± 0,6
4	11,7 ± 0,9	11,7 ± 0,9	19 ± 1
5	11 ± 1	36 ± 3	33 ± 7
6	12 ± 2	52 ± 4	28 ± 6
8	5,7 ± 0,6	16 ± 3	12 ± 6
9	30 ± 4	46 ± 3	55 ± 5
10	3,9 ± 0,1	6,8 ± 0,4	6,6 ± 0,6
11	10 ± 1	16 ± 2	18 ± 3
12	26 ± 2	15 ± 2	12 ± 2
13	47 ± 5	15 ± 2	12 ± 1
14	28 ± 5	78 ± 21	16 ± 2
15	> 200	> 200	> 200

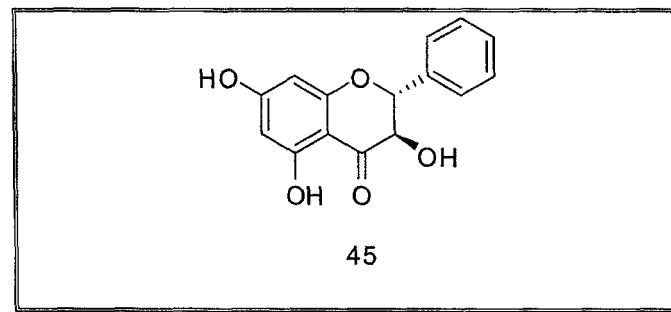


Figure 10 : Structure moléculaire du pinobanksin

4.2.3 Résultats des travaux de fractionnement de l'extrait à l'hexane

4.2.3.1 Fractionnement grossier de l'extrait hexane

L'extrait hexane de bois de pin rouge a été fractionné grossièrement par chromatographie sur gel de silice. Les chromatographies sur couche mince des sept

fractions obtenues (PRHex 1 à PRHex 7) sont présentées à la figure 11. Les résultats de tests d'activité anticancéreuse effectués sur ces fractions sont présentés dans le tableau 7.

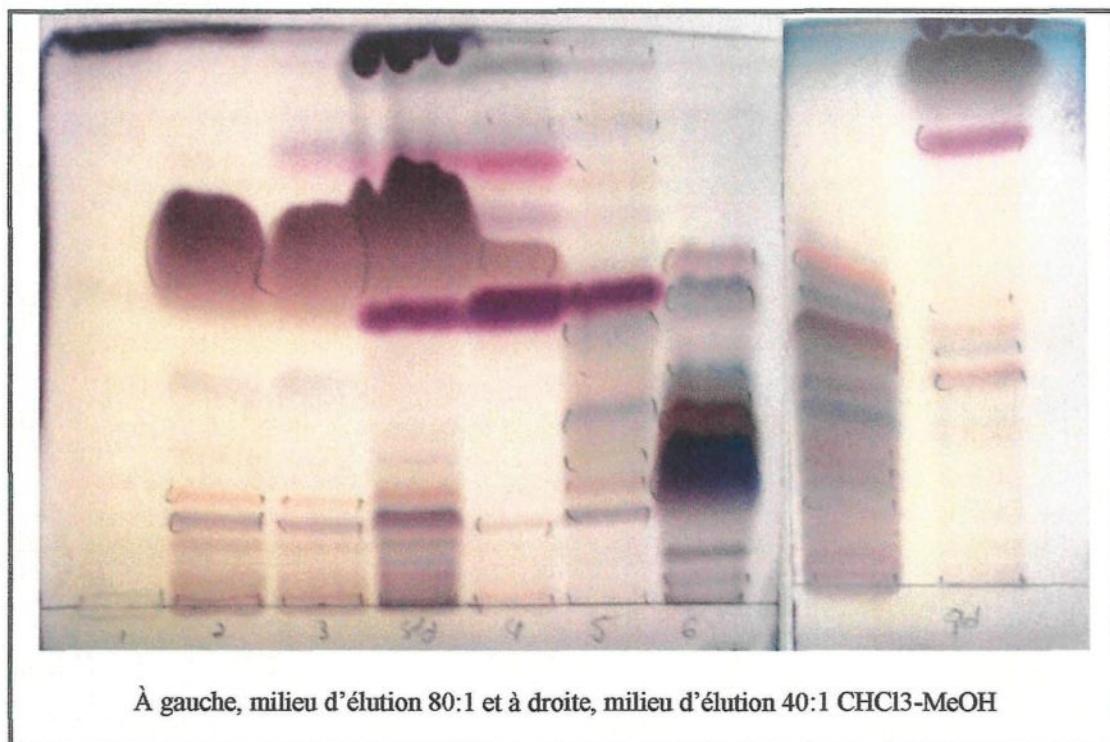


Figure 11 : CCM du fractionnement grossier de l'extrait hexane

Tableau 7 : IC₅₀ du fractionnement de l'extrait hexane de bois de cœur de pin rouge

Fraction	IC ₅₀ (µg/ml)		
	A549	DLD-1	WS1
Extrait dégraissé	36 ± 8	133 ± 18	78 ± 40
PRHex 1	> 200	> 200	> 200
PRHex 2	41 ± 7	61 ± 11	59 ± 11
PRHex 3	89 ± 6	98 ± 10	99 ± 6
PRHex 4	112 ± 6	71 ± 3	114 ± 9
PRHex 5	52 ± 5	38 ± 3	71 ± 6
PRHex 6	> 200	> 200	> 200
PRHex 7	92 ± 10	93 ± 5	100 ± 5

Les fractions PRHex 2 (IC₅₀ de 41 ± 7 µg/ml sur A549, 61 ± 11 µg/ml sur DLD-1 et 59 ± 11 µg/ml sur WS1) et PRHex 5 (IC₅₀ de 52 ± 5 µg/ml sur A549, 38 ± 3 µg/ml sur DLD-1 et 71 ± 6 µg/ml sur WS1) sont celles qui présentent les activités anticancéreuses les plus intéressantes. La CCM de la fraction PRHex 5 a révélé qu'un des composés majoritaires correspond au pinosylvin monométhyl ether, qui a déjà été identifié comme un des composés possédant une cytotoxicité modérée sur les cellules cancéreuses (chapitre 3). Cette observation nous a conduit à nous tourné vers la fraction PRHex 2 (31,83 g) qui a été fractionnée davantage.

4.2.3.2 Travaux d'isolement sur la fraction PRHex 2 de l'extrait hexane

Les analyses par CCM des fractions obtenues lors de la purification de PRHex 2 semblaient montrer qu'un composé pur avait été isolé (fraction PRHex 2.2.f). Une analyse par RMN du proton (annexe 1) a permis de constater que le composé était constitué d'un grand nombre de CH₂, ce qui laissait présager qu'il pourrait s'agir d'un glycéride. L'analyse approfondie du spectre RMN ¹H n'a pas permis de progresser au niveau de l'identification. Une saponification avec le KOH suivie d'une estérification a été effectuée

afin d'être en mesure d'obtenir des informations supplémentaires par GC/MS. L'analyse a montré la présence de deux acides gras estérifiés majoritaires mais aussi la présence de quelques autres acides gras minoritaires (figure 12). La présence de ces acides gras minoritaires semble indiquer que cette fraction était constituée d'un mélange de glycérides.

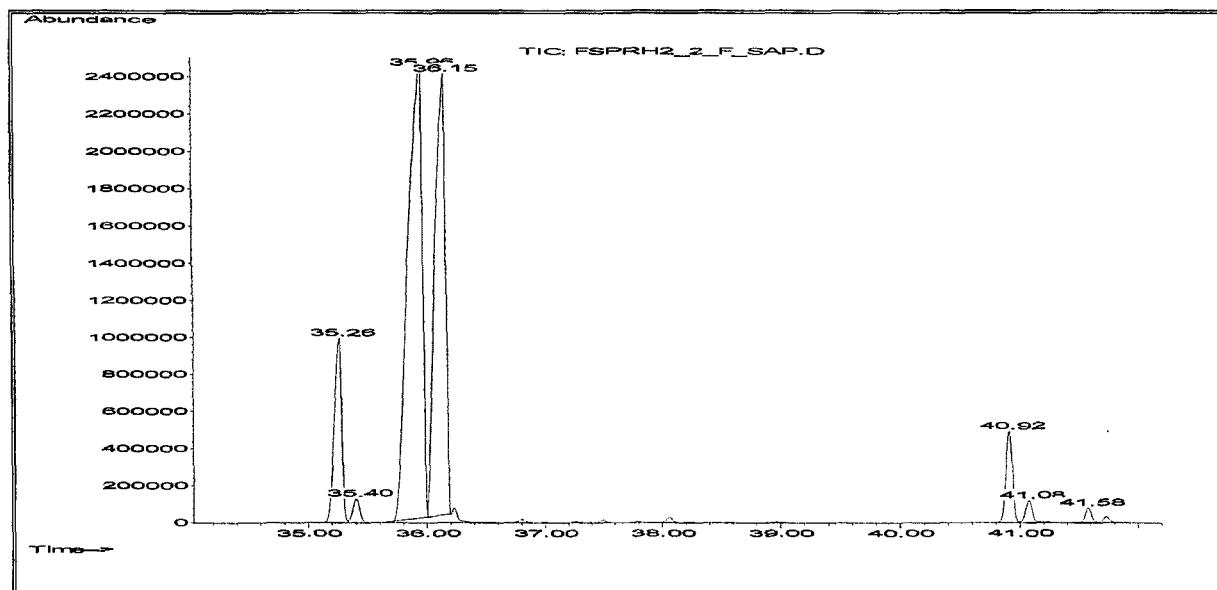


Figure 12 : Analyse par GC/MS de la fraction PRHex 2.2.f après saponification et méthylation

4.2.3.3 Analyse GC-MS du fractionnement de l'extrait hexane

Les chromatogrammes des fractions PRHex 1, 3, 4, 5, 6 et 7 méthylé avec le diazométhane sont présentés aux annexes 2 à 7. Certains acides résiniques présents dans ces fractions ont pu être identifiés par comparaison avec des spectres de masse obtenus à partir de standards. Les composés identifiés dans les différentes fractions ainsi que leurs temps de rétention et leurs pourcentages relatifs dans la fraction sont présentés au tableau 8.

Tableau 8 : Analyse par GC/MS de la composition des fractions PRHex 1 à 7

Fraction	Temps de rétention	Pourcentage relatif	Identification	M.M.
PRHex 1	12,79	32,0	(+)-longifolène*	204
	40,63	2,4	Déhydroabietinal	286
	42,65	1,6	Dehydroabietate de méthyle	314
PRHex 2	n.-d.	n.-d.	n.-d.	n.d.
PRHex 3	39,75	6,9	Pimarate de méthyle	316
	40,24	1,5	Sandaracopimarate de méthyle	316
	41,41	4,0	Isopimarate de méthyle	316
	41,75	20,2	Palustrate de méthyle	316
	42,69	20,6	Déhydroabiétate de méthyle	314
	43,86	24,1	Abietate de méthyle	316
	47,54	0,5	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
PRHex 4	35,77	9,0	Inconnu (ester d'acide gras)	-
	35,97	13,4	Inconnu (ester d'acide gras)	-
	39,73	2,3	Pimarate de méthyle	316
	41,40	0,8	Isopimarate de méthyle	316
	41,72	13,9	Palustrate de méthyle	316
	42,65	11,5	Déhydroabiétate de méthyle	314
	43,81	24,6	Abiétaire de méthyle	316
PRHex 5	35,77	4,4	Inconnu (ester d'acide gras)	-
	35,96	5,5	Inconnu (ester d'acide gras)	-
	41,58	14,0	Pinosylvin monomethyl ether	240
	42,66	4,5	Déhydroabiétate de méthyle	316
	46,72	2,8	inconnu	346
	46,80	9,5	inconnu	360
	47,21	2,1	inconnu	360
	48,44	7,4	inconnu	346
	48,76	8,0	7-Oxodéhydroabietate de méthyle	328
	49,06	26,0	Inconnu majoritaire	360
	49,22	3,5	inconnu	332
PRHex 6	49,63	5,7	inconnu	330
	47,56	42,6	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
	48,39	37,3	Inconnu	332
PRHex 7	48,75	8,8	7-Oxodéhydroabietate de méthyle	328
	46,86	21,7	Inconnu	330
	47,43	8,5	Inconnu	330
	47,54	30,0	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
	48,38	8,7	Inconnu	332

*Identifier à partir de la banque du National Institute of Standards and Technology

La fraction PRHex 1 est constituée principalement de petits terpènes dont le (+)-longifolène est le composé majoritaire. L'acide déhydroabiétique sous forme d'ester et l'aldéhyde correspondant y ont été détectés en faible quantité. Les fractions PRHex 3 et

PRHex 4 sont principalement composées d'acides résiniques, l'acide abiétique et l'acide déhydroabiétique étant les composés majoritairement retrouvés. La fraction PRHex 5 contient des composés majoritaires qui n'ont pu être identifiés ni par la banque d'acides résiniques, ni par la banque du National Institute of Standards and Technology (NIST). La fraction PRHex 6 est constituée majoritairement d'acide 15-hydroxydéhydroabiétique alors que certains des composés présents en grande quantité dans la fraction PRHex 7 n'ont pu être identifiés par les banques et ne sont peut-être pas suffisamment volatiles pour être identifiés par GC/MS.

Les fractions PRHex 2.1 à 2.7 qui ont également été analysées par GC/MS étaient aussi constituées majoritairement d'acides résiniques présents dans la banque. Seule la fraction PRhex 2.7 contient des composés majoritaires qui n'ont pu être identifiés (tableau 9).

Tableau 9 : Analyse par GC/MS de la composition des fractions PRHex 2.1 à 2.7

Fraction	Temps de rétention	Pourcentage relatif	Identification	Masse
PRHex 2.1	37,67	40,8	Inconnu	286
	39,23	13,1	Inconnu	286
	40,64	13,1	Dehydroabietal	284
	41,66	11,8	Abietinal	286
	42,64	9,1	Déhydroabietate de méthyle	314
	43,80	1,7	Abietate de méthyle	316
PRHex 2.2	37,65	2,6	Inconnu	286
	39,81	27,6	Pimarate de méthyle	316
	40,26	5,1	Sandaracopimarate de méthyle	316
	41,44	10,6	Isopimarate de méthyle	316
	41,83	38,6	Palustrate deméthyle	316
	42,66	1,3	Déhydroabiétate de méthyle	314
	43,85	12,9	Abiétaire de méthyle	316
PRHex 2.3	39,78	15,2	Pimarate de méthyle	316
	40,25	3,5	Sandaracopimarate de méthyle	316
	41,43	8,8	Isopimarate de méthyle	316
	41,78	20,5	Palustrate de méthyle	316
	42,67	9,6	Déhydroabiétate de méthyle	314
	43,89	32,5	Abietate de méthyle	316
	45,29	4,9	Inconnu	316
PRHex 2.4	39,74	5,9	Pimarate de méthyle	316
	41,41	3,8	Isopimarate deméthyle	316
	41,72	4,3	Palustrate de méthyle	316
	42,69	50,3	Déhydroabiétate de méthyle	314
	43,82	17,6	Abietate de méthyle	316
	47,55	6,3	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
	48,72	7,0	7-oxodehydroabietate de méthyle	328
PRHex 2.5	41,72	4,7	Levopimarate de méthyle	316
	42,75	78,6	Dehydroabietate de méthyle	314
	43,81	6,8	Abietate de méthyle	316
PRHex 2.6	35,20	3,8	Inconnu (ester d'acide gras)	292
	35,77	9,8	Inconnu (ester d'acide gras)	294
	35,97	6,1	Inconnu (ester d'acide gras)	296
	42,70	64,0	Dehydroabietate de méthyle	314
	47,55	2,0	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
PRHex 2.7	47,56	12,1	15-hydroxydéhydroabietate de méthyle	330
	48,41	23,5	Inconnu	332
	48,76	53,9	Inconnu	332

Les travaux effectués sur l'extrait à l'hexane dans le cadre de cette étude se sont arrêtés à cette étape. Il a été possible de vérifier qu'une fois fractionné, l'extrait à l'hexane avait un certain potentiel anticancéreux. L'analyse des différentes fractions par GC/MS a

aussi permis de vérifier que l'extrait hexane de bois de pin rouge était composé majoritairement d'acides résiniques dont plusieurs ont pu être identifiés à l'aide d'une banque de données créée à partir de standards commerciaux. Les acides résiniques sont des composés caractéristiques de toutes les espèces de pins. Ils constituent la partie non-volatile de l'oléorésine sécrétée par les conifères (Trapp et Croteau, 2001). Parmi ceux identifiés dans les tableaux 8 et 9, l'acide abiétique (41), l'acide déhydroabiétique (42), l'acide isopimarique, l'acide pimarique, l'acide sandaracopimarique et l'acide néoabiétique ont déjà été mentionné dans la littérature concernant le pin rouge (Sato et von Rudloff, 1963). L'acide palustrique, l'acide levopimarique, l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique et l'acide 7-oxodéhydroabiétique n'ont cependant jamais été identifiés dans le pin rouge. Certains des acides résiniques identifiés ont montré des activités chimiopréventive (Minami *et al*, 2002) et antibactérienne (Savluchinske-Feio *et al*, 2006).

Les composés majoritaires des fractions PRHex 2 et PRHex 2.7 n'ont pu être identifiés grâce à cette banque. Ces fractions pourraient contenir des composés d'intérêt pour la découverte de nouvelles molécules bioactives.

4.2.4 Résultats des autres activités biologiques des composés isolés

Comme les composés identifiés dans ces travaux étaient disponibles en quantité suffisante, ils ont été soumis à d'autres tests d'activité biologique disponible au laboratoire. Les activités antibactérienne, antifongique et antioxydante ont été évaluées.

4.2.4.1 Activités antibactérienne et antifongique

Les résultats sont présentés au tableau 10. Le MIC 80 est la concentration minimale qui inhibe 80 % de la croissance cellulaire (Minimum inhibitory concentration). Seul le pinosylvin et le pinosylvin monométhyl ether ont montré de l'activité antibactérienne sur la souche *S. aureus* avec des IC₅₀ de 40 ± 8 et 42 ± 8 µM respectivement. Ces composés ont aussi montré une faible activité antifongique face à *C. albicans* (tableau 10).

Tableau 10 : Activités antibactérienne et antifongique des composés isolés de *Pinus resinosa*

Composés	IC ₅₀ [µM]		MIC 80 ¹ [µM]		IC ₅₀ [µM]
	<i>S. aureus</i> ²	<i>E. coli</i> ³	<i>S. aureus</i> ²	<i>E. coli</i> ³	<i>C. albicans</i> ⁴
Pinosylvin (29)	40 ± 8	102 ± 3	5	160	95 ± 3
Pinosylvin monomethyl ether (30)	42 ± 8	99 ± 6	5	160	64 ± 2
Pinosylvin dimethyl ether (31)	> 160	> 160	10	-	> 200
Resveratrol	> 160	> 160	10	-	> 200
(-)nortrachelogenin (28)	> 160	> 160	-	-	> 200
Chloramphenicol	7 ± 1	0,90 ± 0,06	-	-	-

¹Concentration minimum qui inhibe 80 % de la croissance bactérienne

²*Staphylococcus aureus*

³*Escherichia coli*

⁴*Candida albicans*

4.2.4.2 Activité antioxydante

Selon l'indice ORAC, le composé qui a montré l'activité antioxydante la plus intéressante est le (-)-nortrachelogenin avec un indice de 22 ± 5 µM de trolox /mg. Le pinosylvin dimethyl ether montre la meilleure activité antioxydante sur cellules (IC₅₀ 3 ± 1 µg/ml). L'activité antioxydante des autres composés est plus faible avec des indices ORAC variant de 6,88 ± 0,05 à 0,33 ± 0,02 µM de trolox /mg (tableau 11).

Tableau 11 : Activité antioxydante des composés isolés de *Pinus resinosa*

Composés	Indice ORAC (µM de trolox /mg)	IC ₅₀ (µg/ml)
Pinosylvin (29)	6,88 ± 0,05	9 ± 1
Pinosylvin monomethyl ether (30)	-	-
Pinosylvin dimethyl ether (31)	0,33 ± 0,02	3 ± 1
Resveratrol	25 ± 5	-
(-)nortrachelogenin (28)	22 ± 5	8 ± 2

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'extrait au MeOH de pin rouge a montré une activité anticancéreuse très intéressante puisqu'il était plus毒ique envers les cellules cancéreuses qu'envers les cellules saines. Des travaux de purification guidés par l'activité anticancéreuse ont été entrepris sur cet extrait et 5 composés ont été isolés et identifiés. Le pinosylvin monométhyl éther est en partie responsable de l'activité anticancéreuse de l'extrait MeOH de pin rouge. Ce composé n'explique cependant pas à lui seul la cytotoxicité sélective face aux cellules cancéreuses obtenue avec les extraits et les fractions. L'objectif principal d'identifier les composés responsables de l'activité sélective de l'extrait n'a donc pas été complètement atteint. Il est possible que l'activité sélective obtenue pour l'extrait était dû à l'action de deux ou plusieurs composés agissant en synergie. Cette hypothèse expliquerait l'absence de sélectivité pour le composé isolé. Des travaux de purification sur l'extrait DCM pourrait révéler que les composés responsables de la sélectivité étaient présents dans cette fraction.

Le pinosylvin a montré une activité anticancéreuse plus faible alors que le pinosylvin diméthyl éther, le pinobanksin et le (-)-nortrachelogenin, n'ont montré aucune activité *in vitro* sur les lignées cellulaires aux concentrations testées.

L'extrait à l'hexane du bois de pin rouge, qui n'a pas pu être testé sur cultures cellulaires en raison de sa faible solubilité dans les milieux de culture, a été également fractionné par chromatographie. Les sept fractions ainsi obtenues ont été testées sur les cultures cellulaires et analysées par GC-MS en comparant avec des standards d'acide résiniques et dérivés. Plusieurs composés ont ainsi pu être identifiés. La fraction PRHex 2 (plus cytotoxique) a été fractionnée par chromatographie sur colonne. Ces fractions ont

aussi été analysées par GC-MS en utilisant la même banque de données et plusieurs des composés majoritaires ont ainsi pu être identifiés

Enfin, les activités antibactérienne, antifongique et antioxydante ont aussi été évaluées pour les cinq composés isolés. Seul le pinosylvin et le pinosylvin monomethyl ether ont montré une faible activité sur *S. aureus* et sur *C. albicans*.

Maintenant que le pinosylvin monomethyl ether a été identifié comme un composé provenant du bois de pin rouge et ayant une activité anticancéreuse modérée, il serait intéressant de vérifier si ce composé possède réellement un potentiel de développement en tant qu'anticancéreux. Pour évaluer si ce composé a réellement un potentiel, il est nécessaire d'évaluer son activité sur un modèle de souris porteuses de tumeur. Cependant, il serait intéressant d'évaluer son spectre sur d'autres lignées de cellules cancéreuses. Des études préliminaires de mécanisme d'action pourraient aussi être effectuées, ce qui donnerait plus d'informations sur le potentiel réel de développement de ce composé. Il serait important de vérifier la disponibilité de la molécule dans la plante ou de déterminer d'autres voies d'approvisionnement. Comme le pinosylvin monomethyl ether semble être un composé majoritaire du bois du pin rouge mais aussi d'autres espèces de pin de la forêt boréale, l'extraction pourrait être une bonne façon d'obtenir le pinosylvin monomethyl ether en grande quantité. Vu la simplicité de la structure du pinosylvin monomethyl ether, une voie de synthèse pourrait aussi être envisagée.

Certaines fractions qui n'ont pas montré de potentiel pour l'activité anticancéreuse pourraient être évaluées pour d'autres types d'activités. Par exemple, la partie polaire de l'extrait MeOH (celle soluble dans l'eau) qui n'a montré aucune activité anticancéreuse ni

cytotoxicité envers les cellules saines, pourrait être soumise aux tests d'activités antioxidant, antibactérienne ou antifongique.

Les travaux sur l'extrait à l'hexane ne sont pas terminés et comme le montrent les résultats préliminaires, certaines fractions ont une activité anticancéreuse intéressante. Différents composés n'ont pu être identifiés par les banques de données MS et pourraient être de nouvelles molécules. Cette étude a cependant aussi permis de vérifier que les rendements d'extractions du bois des conifères sont souvent faibles et que beaucoup de matière première est nécessaire. Il faudra tenir compte de ce désavantage lors des travaux futurs.

CHAPITRE VI

BIBLIOGRAPHIE

- Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin, C.; 2003, Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 52, p. 796-800.
- Barrera, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; 1992, Sesquiterpenes and Phenylpropanoids from *Seseli vayredanum*. *Phytochemistry*: 47, p. 203-207.
- Beninger, C. W.; Abou-Zaid, M. M.; 1997, Flavonol Glycosides from Four Pine Species that Inhibit Early Instar Gypsy Moth (Lepidoptera: Lumantriidae) Development. *Biochemical Systematics and Ecology*: 25 (6), p. 505-512.
- Blodgett, J. T.; Stanosz, G. R.; 1997, Differential Inhibition of *Sphaeropsis sapinea* Morphotypes by a Phenolic Compound and Several Monoterpenes of Red Pine. *Biochemistry and Cell Biology*: 87 (6), p. 606-609.
- Burns, R. M.; Barbara H. H.; coord. Tech.; 1990, Silvics of North America: 1. Conifers; 2. Hardwoods. Agriculture Handbook 654. [en ligne] U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC: vol.2, 877 p. <http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_1/silvics_voll.pdf#xml=http://www.na.fs.fed.us/cgi-bin/texis.exe/Webinator/search/xml.txt?query=silvics+manual&pr=default&prox=page&rorder=500&rprox=500&rdfreq=500&rwfreq=500&rlead=500&sufs=0&order=r&cq=&id=4665e32d29> visité le 28 avril 2008.
- Cameron, S. I.; Smith, R. F.; 2002a, Ramener Sur Terre la Biologie Fondamentale - Arrimer la recherche sur les produits naturels et la commercialisation. [en ligne] Ressources naturelles Canada <http://www.atl.cfs.nrcan.gc.ca/index-f/what-f/science-f/nontimberforestproducts-f/PGRSA_Final_SIC_Doc-f.html> Consulté le 26 juillet 2006.
- Cameron, S. I.; Smith, R. F.; 2002b, L'if du Canada (*Taxus canadensis*) Pourquoi suscite-t-il tant d'intérêt? [en ligne] Ressources Naturelles Canada <http://www.atl.cfs.nrcan.gc.ca/index-f/what-f/science-f/nontimberforestproducts-f/general_taxus-f.html> Consulté le 26 juillet 2006.
- Carpentier, B.; 2000, Les Arbres du Québec. Les Publications du Québec, Québec, Canada, 74 pages.
- Celimene, C. C.; Micales, J. A.; Ferge, L.; Young, R. A.; 1999, Efficacy of Pinosylvins against White-rot and Brown-Rot Fungi. *Holzforschung*: 53, p. 491-497.
- Celimene, C. C.; Smith, D. R.; Young, R. A.; Stanosz, G. R.; 2001, In vitro Inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry*: 56, p. 161-165.
- Cheng, Y.-S.; Chen, E. H. T.; Fang, G. J. M.; 1975, The Neutral Part of the Bark of *Pinus luchuensis* Mayer. *Journal of Chinese Chemical Society*: 22, p. 341-347.
- Conner, A. H.; Nagasampagi, B. A.; Rowe, J. W.; 1984, New Serratane triterpenes from Western White Pine Bark. *Tetrahedron*: 40 (21), p. 4217-4226.
- CREDD Saguenay Lac-St-Jean; 2005, Saguenay Lac-St-Jean: L'une des plus Grandes Régions Forestières du Québec. [en ligne] <http://www.auxarbresctoyens.com/article.php?id_article=0017> Consulté le 26 juillet 2006.
- Cui, Y.; Xie, H.; Wang, J.; 2005a, Potential Biomedical Properties of *Pinus massoniana* Bark Extract. *Phytotherapy Research*: 19, p. 34-38.

- Cui, Y. Y.; Xie, H.; Qi, K. B.; He, Y. M.; Wang, J. F.; **2005b**, Effects of *Pinus massoniana* Bark, Extract on Cell Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma BEL-7402 Cells. *World Journal of Gastroenterology*: 11 (34), p. 5277-5282.
- Duchesne, L. C.; Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grand Lacs; **2003**, Les Produits Forestiers Non Ligneux au Canada – Une Industrie en Développement. [en ligne] Nouvelles Express, Bulletin No. 28, <http://www.gxfc.cfs.nrcan.gc.ca/frontline/bulletins/bulletin_no.28_f.html> Consulté le 26 juillet 2006.
- Eberhardt, T. L.; Young, R. A.; **1994**, Conifer Seed Cone Proanthocyanidin Polymers: Characterization by ¹³C NMR Spectroscopy and Determination of Antifungal Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 42, p. 1704-1708.
- Frère Marie Victorin; **1995**, Flore Laurentienne. *Les presses de l'Université de Montréal*, Montréal, Canada, 1083 p.
- Gagnon, D.; **2004**, La forêt du Québec, un survol. Rapport préparé pour la Commission d'étude sur la gestion de la forêt publique québécoise, [en ligne] <http://www.commission-foret.qc.ca/pdf/Gagnon_foret_naturelle_final.pdf> Consulté le 20 décembre 2006.
- Grassmann, J.; Hippeli, S.; Vollmann, R.; Wlstner, E. F.; **2003**, Antioxidative Properties of the Essential Oil from *Pinus mugo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, p. 7576-7582.
- Hart, J. H.; **1981**, Role of Phytostilbenes in Decay and Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*: 19, p. 437-458.
- Harvey, A.; **2000**, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*: 5 (7), p. 294-300.
- Hong, E. J.; Na, K. J.; Choi, I. G.; Choi, K. C.; Jeung, E. B.; **2004**, Anticacterial and Antifungal Effects of Essentials Oils from Coniferous Trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*: 27 (6), p. 863-866.
- Huang, W. W.; Yang, J. S.; Lin, C. F.; Ho, W. J.; Lee, M. R.; **2005**, Pycnogenol Induces Differentiation and Apoptosis in Human Promyeloid Leukemia HL-60 Cells. *Leukemia Research*: 29, p. 685-692.
- Hsu, T. Y.; Sheu, S. C.; Liaw, E. T.; Wang, T. C.; Lin, C. C.; **2005**, Anti-oxidant Activity and Effect of *Pinus morrisonicola* Hay. on the Survival of Leukemia Cell Line U937. *Phytomedicine*: 12, p. 663-669.
- Jung, M. J.; Chung, H. Y.; Choi, J. H.; Choi, J. S.; **2003**, Antioxidant Principles from the Needles of Red Pine, *Pinus densiflora*. *Phytotherapy Research*: 17, p. 1064-1068.
- Ka, M. H.; Choi, E. H.; Chun, H. S.; Lee, K.-G.; **2005**, Antioxidante Activity of Volatiles Extracts Isolated from *Angelica tenuissimae* Roots, Peppermint Leaves, Pine Needles, and Sweet Flag Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 53, p. 4124-4129.
- Kim, Y. S.; Shin, D. H.; **2005**, Volatile Components and Anticacterial Effects of Pine Needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiology*: 22, p. 37-45.
- Krauze-Baranowska, M.; Mardarowicz, M.; Wiwart M.; Poblocka, L.; Dynowska, M.; **2002**, Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*: 57, p. 478-482.

- LaFever, R. E.; Vogel, B. S.; Croteau, R.; 1994, Diterpenoid Resin Acid biosynthesis in Conifers: Enzymatic Cyclization of Geranylgeranyl Pyrophosphate to Abietadiene, the Precursor of Abietic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 313 (1), p. 139-149.
- 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*: 69, p. 402-407.
- Lindberg, L. E.; Willför, S. M.; Holmbom, B. R.; 2004, Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*: 31 (3), p. 137-147.
- McLaughlin, J. R.; Dryer, D.; Mao, Y.; Marret, L.; Mills, C.; Morrison, H.; Schacter, B.; Villeneuve, G.; Waters, C.; Semeneiw, R.; 2005, Société Canadienne du Cancer/Institut National du Cancer du Canada, Statistiques Canadiennes sur le Cancer 2005. [en ligne] <http://www.ncic.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86755361/8/14/400105690cw_stats_2005_fr.pdf> Consulté le 26 juillet 2006.
- Minami, T.; Wada, S. I.; Tokuda, H.; Tanabe, G.; Muraoka, O.; Tanaka, R.; 2002, Potential Antitumor-Promoting Diterpenes from the Cones of *Pinus luchuensis*. *Journal of Natural Products*: 65, p. 1921-1923.
- Ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs; 2004, Portrait Forestier des Régions du Saguenay Lac-St-Jean et du Nord du Québec (Chibougamau-Chapais). [en ligne], 99 pages, <http://www.commission-foret.qc.ca/pdf/Portrait_forestier_Sag-Lac.pdf> Consulté le 26 juillet 2006.
- Moerman, D.E.; 2000, Native american ethnobotany. Third edition, Ed. Timber Press Inc., Portland, USA, 927 p.
- Morrison, W. R.; Smith L. M.; 1964, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of lipid research*: 5, p. 600-608.
- National Institute of Standards and Technology; Mass spectral Library. Gaithersburg, [http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm].
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; 2003, Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*: 66, p. 1022-1037.
- Nuopponen, M.; Willför, S.; Jääskeläinen, A. S.; Sundberg, A.; Vuorinen, T.; 2004, A UV resonance Raman (UVRR) spectroscopic study on the extractable compounds of Scots pine (*Pinus sylvestris*) wood Part I: Lipophilic compounds. *Spectrochimica Acta Part A*: 60, p. 2953-2961.
- O'brien, J.; Pinus resinosa. US Forest Service Northeastern area, [en ligne], <http://www.na.fs.fed.us/Spfo/for_images/miscimage.htm> consulté 31 juillet 2006.
- 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*: 49, p. 4619-4626.
- Packer, L.; Rimbach, G.; Virgili, F.; 1999, Antioxidant Activity and biologic Properties of a Procyanidin-rich Extract from Pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*: 27, p. 704-724.

- Phillips, M. A.; Croteau R. B.; 1999, Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science, reviews*: 4 (5), p. 184-190.
- Rauha, J. P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Dähkönen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P.; 2000, Antimicrobial Effects of Finnish Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds. *International Journal of Food Microbiology*: 56, p. 3-12.
- Ritch-Krc, E. M.; Turner, N. J.; Towers, G. H. N.; 1996, Carrier herbal Medicine: an Evaluation of the Antimicrobial and Anticancer Activity in some Frequently Used Remedies. *Journal of ethnopharmacology*: 52, p. 151-156.
- Rohdewald, P.; 2002, A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*: 40 (4), p. 158-168.
- Romani, A.; Ieri F.; Turchetti, B.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F.; Buzzini, P.; 2006, Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: 41, p. 415-420.
- Rowe J. W.; 1989, Natural Products of Woody Plants vol. 1 et 2. Springer Verlag, Berlin, a) p. 371; b) 384; c)p. 513; d) p. 785.
- Sato A.; von Rudloff, E.; 1964, The Heartwood Extractives of Pinus Resinosa Ait. *Canadian Journal of Chemistry*: 42, p. 635-640.
- Savluchinske-Feio, S.; Marcelo Curto, M. J.; Gigante, B.; Roseiro, J. C.; 2006, Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 72, p. 430-436.
- Smith, E.; Williamson, E.; Zloh, M.; Gibbons, S.; 2005, Isopimaric Acid from Pinus nigra Shows Activity against Multidrug-resistant and EMRSA Strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*: 19, p. 538-542.
- Stermitz, F. R.; Tawara, J. N.; Boeckli, M.; Pomerov, M.; Foderaro, T. A.; Todd F. G.; 1994, Piperidine Alkaloid content of *Picea* (Spruce) and *Pinus* (Pine). *Phytochemistry*: 35 (4), p. 951-953.
- Suga, T.; Ohta, S.; Munesada, K.; Ide, N.; Kurokawa, M.; Shimizu, M.; Ohta, E.; 1993, Endogenous Pine Wood Nematicidal substances in Pines, *Pinus Massoniana*, *P. strobus* and *P. Palustris*. *Phytochemistry*: 33 (6), p. 1395-1401.
- Tallent, W. H.; Stromberg, V. L.; Horning, E. C.; 1955, Pinus Alkaloids. The Alkaloids of *P. sabiniana* Dougl. And related Species. *Journal of American Chemical Society*: 77, p. 6361-6364.
- Tawara, J. N.; Blokhin, A.; Foderaro, T. A.; Stermitz, F. R.; 1993, Toxic Piperidine Alkaloids form Pine (*Pinus*) and Spruce (*Picea*) Trees. New Structures and a biosynthetic Hypothesis. *Journal of Organic Chemistry*: 58, p. 4813-4818.
- Thompson, R. S.; Anderson, K. H.; Bartlein, P. J.; 1999, Atlas of Relations Between Climatic Parameters and Distributions of Important Trees and Shrubs in North America. *U.S. Geological Survey Professional Paper*, [en ligne] <<http://pubs.usgs.gov/pp/p1650-a/>>, consulté le 31 juillet 2006.
- Touriño, S.; Selga, A.; Jiménez, A.; JuliÁ, L.; Lozano, C.; LizÁrraga, D.; Cascante, M.; Torres, J. L.; 2005, Procyanidin Fractions form Pine (*Pinus pinaster*) Bark: Radical Scavenging Power in Solution, Antioxidant Activity in Emulsion, and Antiproliferative

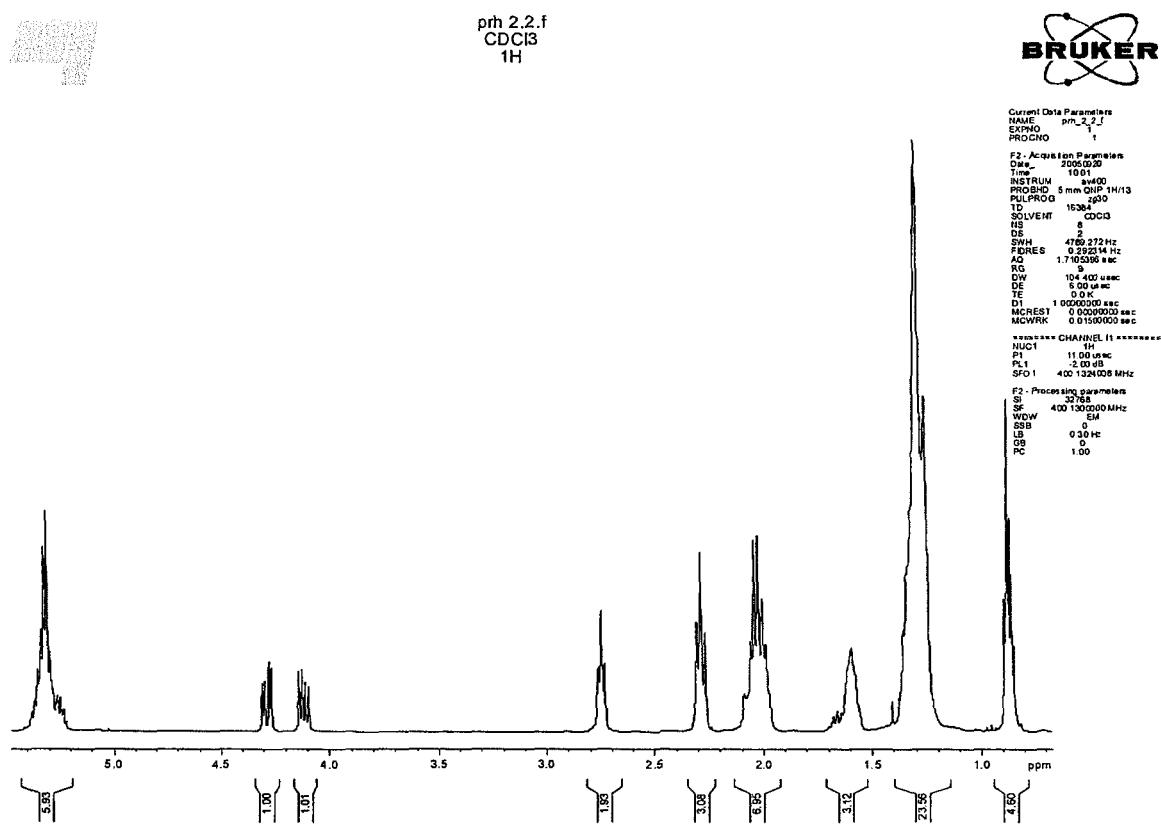
- Effect in Melanoma Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 53, p. 4728-4735.
- Trapp, S.; Croteau, R.; 2001, Defensive Resin Biosynthesis in Conifers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 52, p. 689-724.
- Tsitsimpikou, C.; Petrakis, P. V.; Ortiz, A.; Harvala, C.; Roussis, V.; 2001, Volatile Needle Terpenoids of Six *Pinus* Species. *J. Essent. Oil Res.*: 13, p. 174-178.
- Turgeon, M.; Gouvernement du Québec, Ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs; 2003, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers, Aperçu des Produits forestiers non Ligneux. [en ligne], 11 pages, <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/entreprises/apercu_PFNL.pdf> Consulté le 26 juillet 2006.
- Tringali, C.; 2001, Bioactive Compounds from Natural sources: Isolation, Characterization and biological properties. Taylor & Francis, London, chapitre 1 et 6.
- Vuorela, S.; Kreander, K.; Karonen, M.; Nieminen, R.; Hämäläinen, M.; Galkin, A.; Laitinen, L.; Salminen, J. P.; Moilanen, E.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P.; Heinonen, M.; 2005, Preclinical Evaluation of Rapeseed, Raspberry, and Pine Bark Phenolics for Health Related Effects. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*: 53, p. 5922-5931.
- Wada, S.-I.; Tanaka, R.; 2000, Four New Trisnorlanostene-Type Triterpenoids from the Stem Bark of *Pinus luchuensis*. *Journal of Natural Products*: 63, p. 1055-1057.
- Wada, S.-I.; Tanaka, R.; 2005, Synthetic lanostane-type triterpenoids as inhibitors of DNA topoisomerase II. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*: 15, p. 2966-2969.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M.; 1984, Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Willför S. M.; Ahotupa, M. O.; Hemming, J. E.; Reunanen, M. H. T.; Eklund, P. C.; Sjöholm, R. E.; Eckerman, C. S. E.; Pohjamo, S. P.; Holmbom, B. R.; 2003a, Antioxidant activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, p. 7600-7606.
- Willför, S.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Holmbom, B.; 2003b, Phenolic and Lipophilic Extractives in Scots Pine Knots and Stemwood. *Holzforschung*: 57, p. 359-372.
- Wisconsin Department of Natural Resources; 2005, Red or Norway Pine (*Pinus resinosa*) [en ligne], <<http://www.dnr.state.wi.us/org/land/Forestry/TreeID/TreePgs/pinusres.htm>> Consulté le 28 juillet 2006.
- Yu, E. J.; Kim, T. H.; Kim, K. H.; Lee, H. J.; 2004, Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pine) needles. *Flavour and Fragrance Journal*: 19, p. 532-537.
- Zinkel, D. F.; Evans, B. B.; 1972, Terpenoids of *Pinus Strobus* Cortex Tissue. *Phytochemistry*: 11, p. 3387-3389.
- Zinkel, D. F.; Clarke, W. B.; 1985, Resin Acids of *Pinus resinosa* needles. *Phytochemistry*: 24 (6), p. 1267-1271.
- Zinkel, D. F.; Magee, T. V.; 1987, Diterpene resin acids from the needle oleoresin of *Pinus strobus*. *Phytochemistry*: 26 (3), p. 769-774.
- Zinkel, D. F.; Russel, J.; 1989, Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization. Pulp Chemicals Association, New-York, a) p. 227-229; b) p. 262-270.

Zulaica-Villagomez, H.; Peterson, D. M.; Herrin, L.; Young, R. A.; **2002**, Antioxidant Activity of Different Components of Pine Species. *Holzforschung*: 59, p. 156-162.

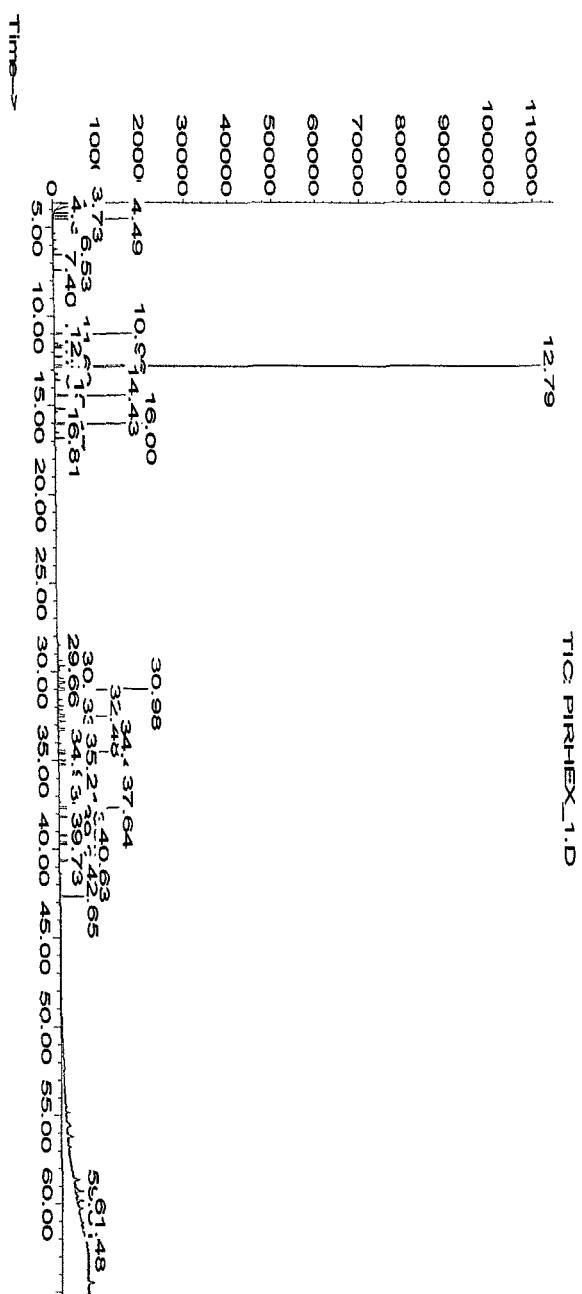
CHAPITRE VII

ANNEXES

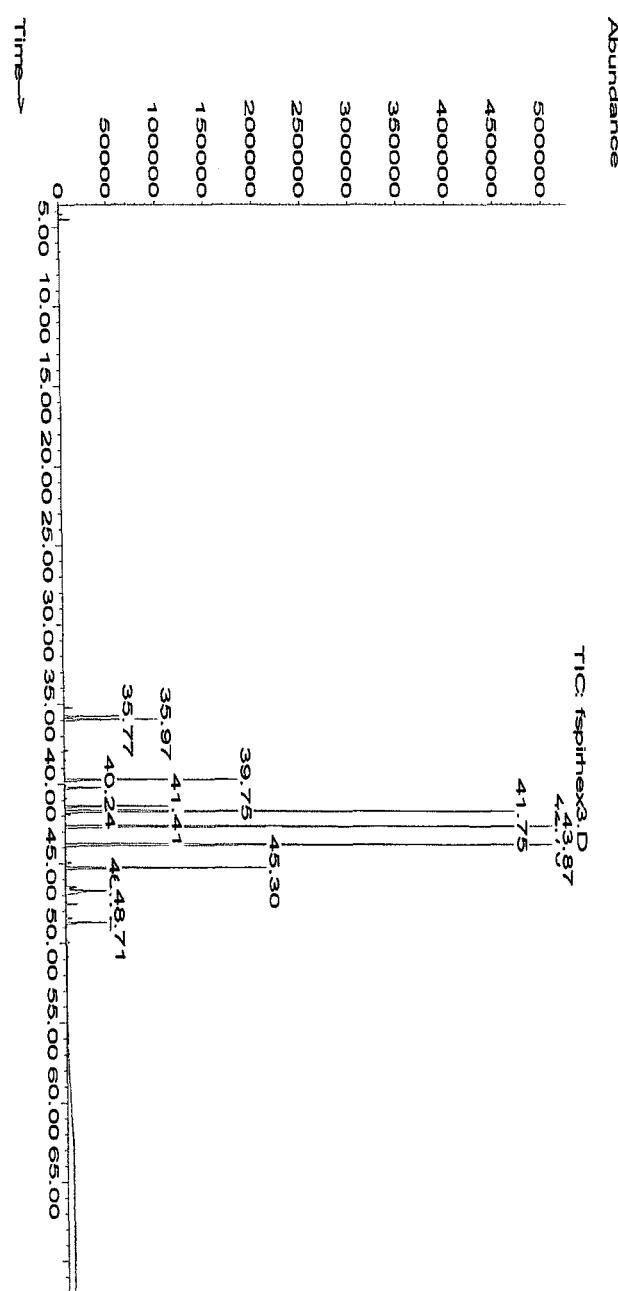
Annexe 1: RMN du proton de PRHex 2.2.f



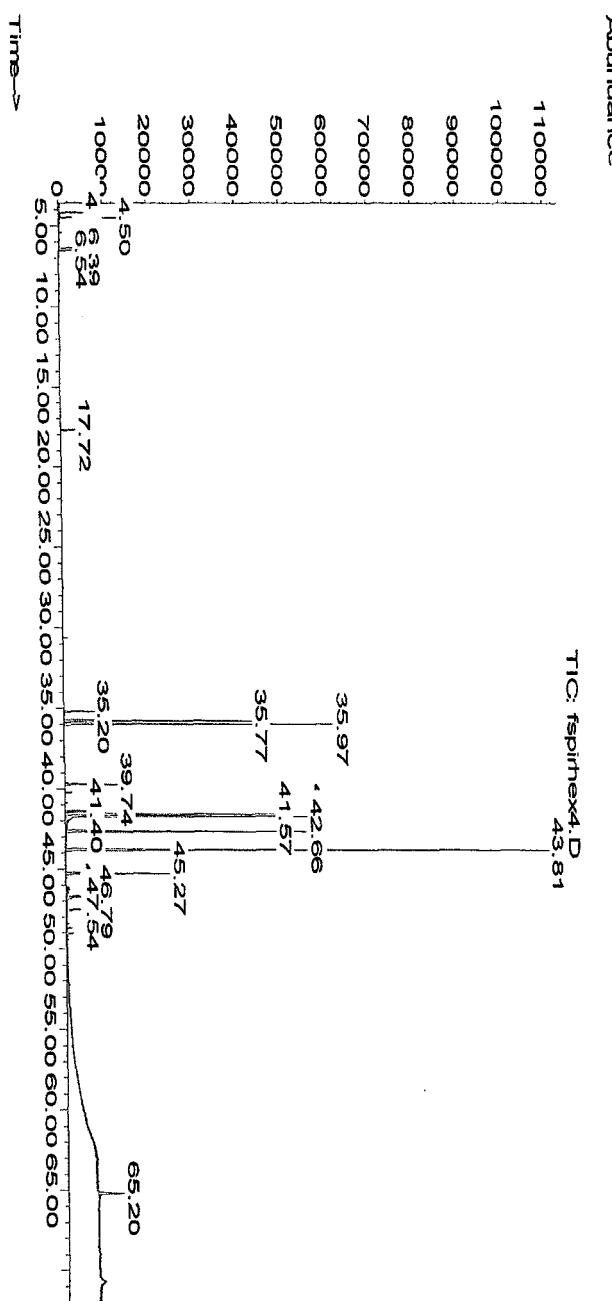
Annexe 2 : Chromatogramme de la fraction PRHex 1



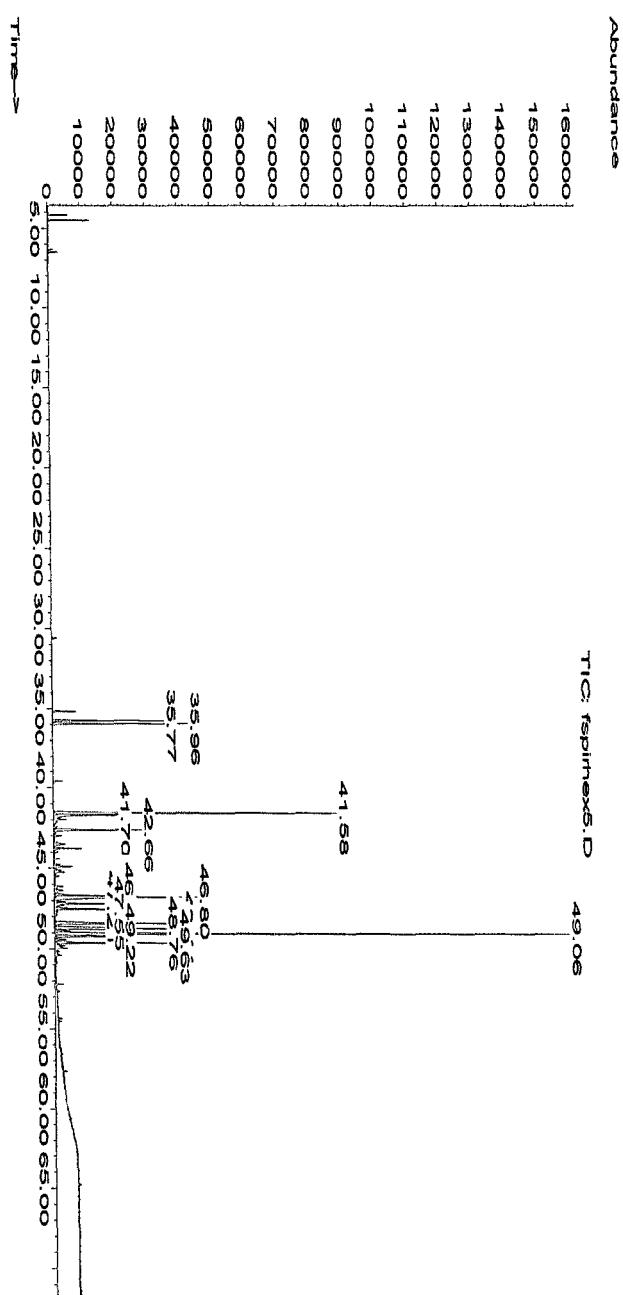
Annexe 3 : Chromatogramme de la fraction PRHex 3



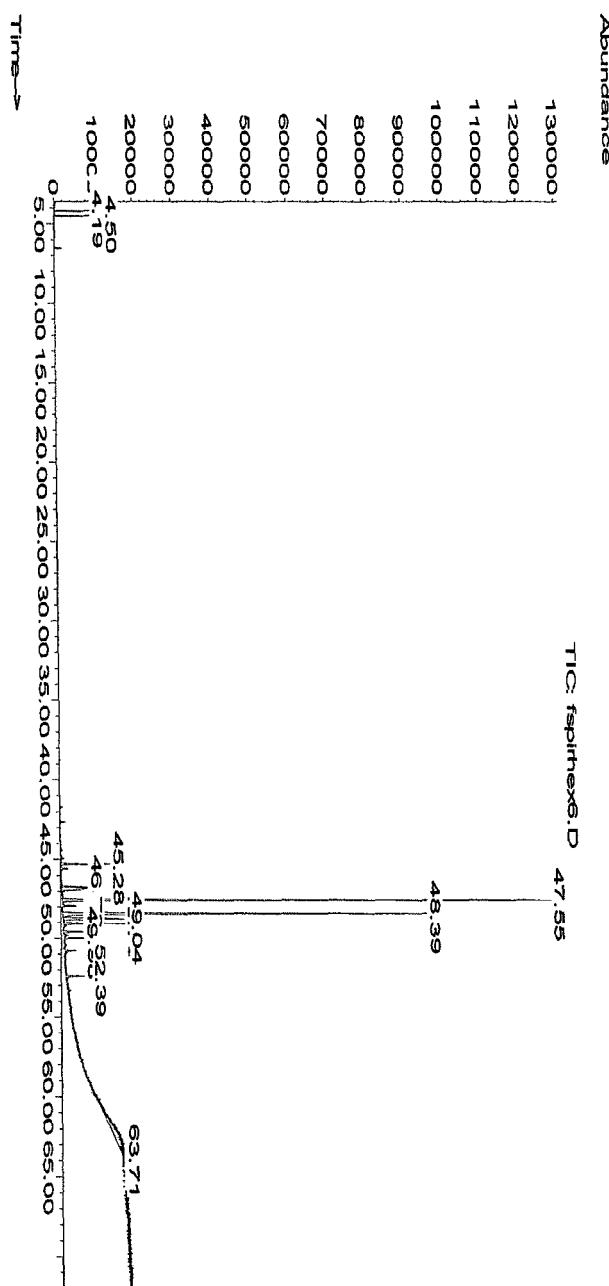
Annexe 4 : Chromatogramme de la fraction PRHex 4



Annexe 5 : Chromatogramme de la fraction PRHex 5



Annexe 6 : Chromatogramme de la fraction PRHex 6



Annexe 7 : Chromatogramme de la fraction PRHex 7

