



DÉVELOPPEMENT DE VOIES DE VALORISATION POUR LES DÉCHETS DE BOIS DE L'INDUSTRIE DU SCIAGE ET POUR LES RÉSIDUS DE LA COUPE FORESTIÈRE

Par: François Simard et André Pichette, Ph.D.

Avec la participation de:

Jean Legault, Ph.D., UQAC

Joël Fournier, Ph.D., CÉPROCQ

Yacine Boumghar, Ph.D. CÉPROCQ



Problématique



- Importance de la forêt boréale au Québec
 - L'industrie forestière a généré des exportations de 11 millions de dollars en 2004¹
 - Elle a aussi généré plus de 77 000 emplois directs¹
- Génération de quantités importantes de résidus forestiers
 - 2 millions de m³ de sciures et de planures en 2005¹
- Ces résidus sont actuellement valorisés principalement sous forme de biomasse énergétique et pour la fabrication de panneaux
- Développer une nouvelles voie de valorisation sous forme de produits pharmaceutiques pourrait augmenter la valeur économique de ces résidus

¹Ministère des Ressource Naturelles et de la Faune, Ressources et Industries Forestières, Portrait Statistique Édition 2007.



Problématique



- Potentiel de découverte de nouveaux agents thérapeutiques des résidus de bois
 - Peu de travaux analytiques et d'études sur le potentiel d'utilisation dans le domaine biopharmaceutique
 - Plusieurs activités recensées dans des espèces apparentées
 - Activité anticarcinogène des terpènes de *Thuja standishi*²
 - Activité anticancéreuse d'acides résiniques (diterpènes)³
 - Terpènes possédant une forte activité antibactérienne contre plusieurs lignées de bactéries⁴

²Iwamoto, M. *et al.*, *Planta Med.*, **2003**, 69(1), 69-72.

³Sommit, D. *et al.*, *Planta Med.*, **2003**, 69(2), 167-170.

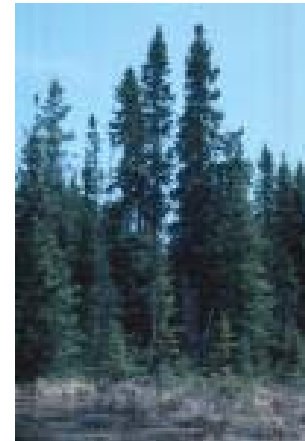
⁴Ulubelen, A. *et al.*, *Planta Med.*, **2000**, 66, 458-462.



Espèces à l'étude



- Épinette noire (*Picea mariana*)
- Pin gris (*Pinus banksiana*)
- Pin rouge (*Pinus resinosa*)
- Pin blanc (*Pinus strobus*)
- Cèdre (*Thuja occidentalis*)
- Épinette blanche (*Picea glauca*)
- Peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*)
- Sapin baumier (*Abies balsamea*)
- Bouleau blanc (*Betula papyrifera*)
- Bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*)



*Picea mariana*⁵



*Populus tremuloides*⁵



*Betula papyrifera*⁵



*Pinus banksiana*⁵

⁵Ressources naturelles Canada, www.rncan.gc.ca



Objectifs

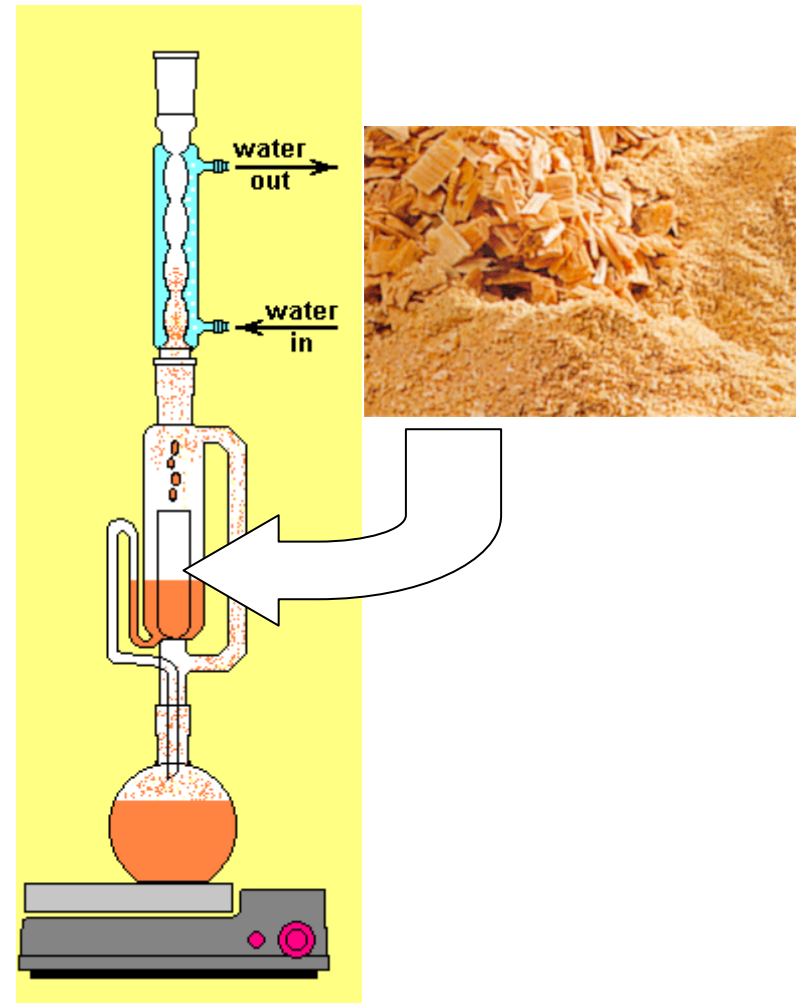


- Extraction des produits naturels selon les différentes méthodes éprouvées au laboratoire
 - Évaluation des activités anticancéreuse et antibiotique des extraits
 - Identification des composés responsables de la bioactivité des extraits les plus prometteurs
 - Évaluation de l'innocuité des composés bioactifs sur des cultures cellulaires
 - Optimisation des méthodes d'extraction et de purification des composés bioactifs en vue d'un développement à grande échelle
-



Méthodologie

- Extractions au Soxhlet avec des solvants de polarité croissante
 - Hexane
 - Dichlorométhane (DCM)
 - Méthanol (MeOH)
 - Eau (H₂O)
- Rendements
 - Masses d'extraits sèches/masse de matière végétale





Méthodologie



- Évaluation de l'activité anticancéreuse *in vitro*
 - Lignées cellulaires du cancer du poumon (A549) et du cancer du colon (DLD-1)
 - Comparaison avec une lignée de cellules saines (fibroblastes humains, WS1)
 - Mesure de l'inhibition de la croissance par exposition des cellules à des concentrations croissantes d'extraits pendant 48 heures
 - Mesure de la quantité de cellules vivantes par la fluorescence induite par la métabolisation de la résazurine en résorufine
 - IC₅₀: concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire
-



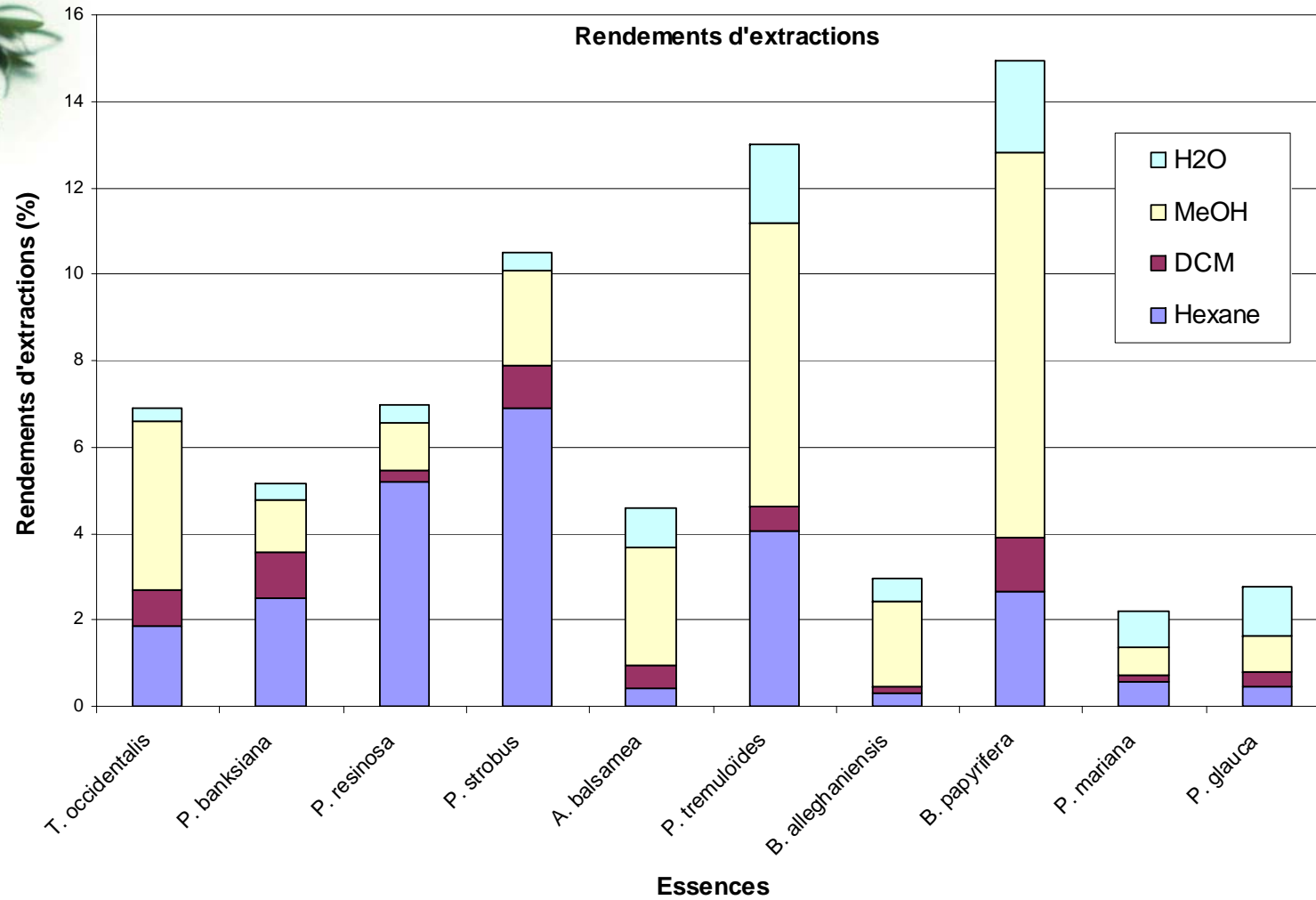
Méthodologie



- Évaluation de l'activité antibiotique *in vitro*
 - Sur deux souches bactériennes
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus aureus*
 - Mesure de l'inhibition de la croissance par exposition des bactéries à des concentrations croissantes d'extraits pendant 6 à 8 heures
 - Plusieurs antibiotiques sont utilisés comme témoins positifs (gentamycine, streptomycine et pénicilline)
 - L'IC₅₀ est déterminée par une mesure de la fluorescence comme pour les tests d'activité anticancéreuse
-

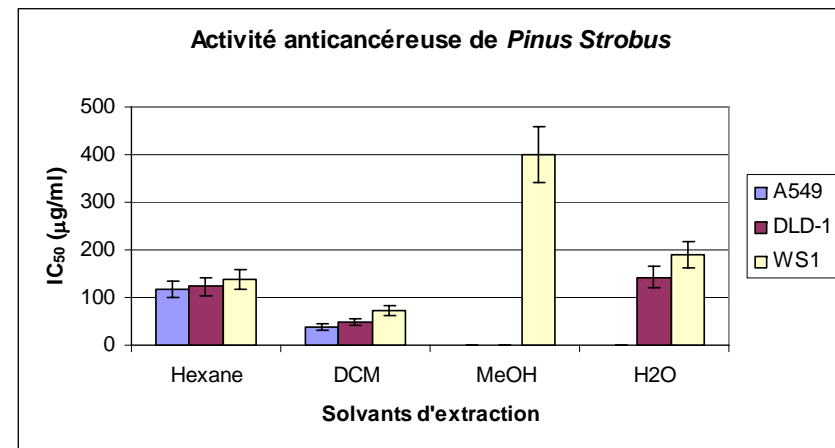
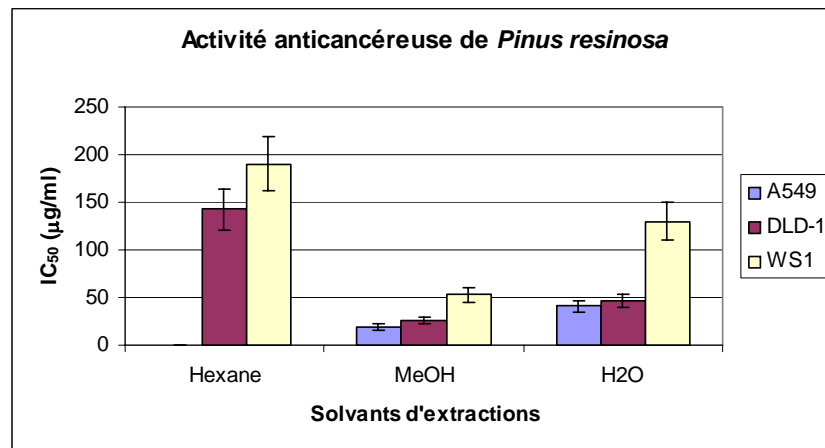
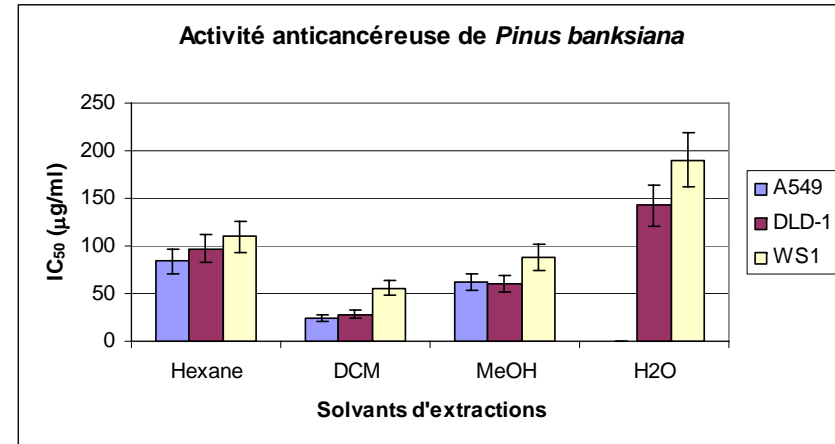
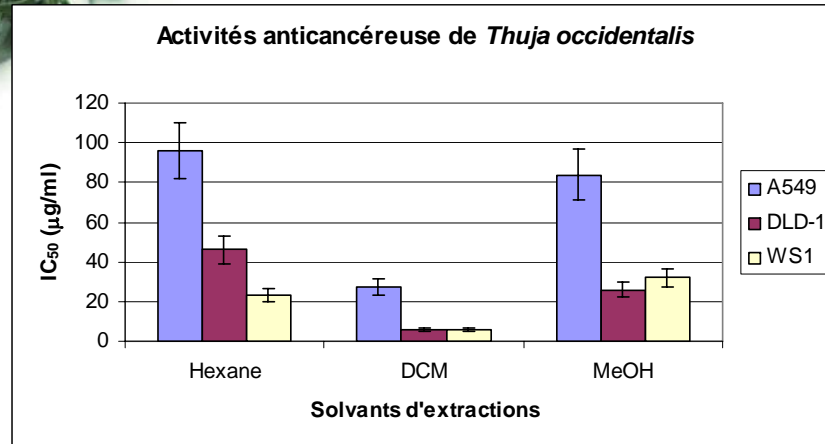


Résultats



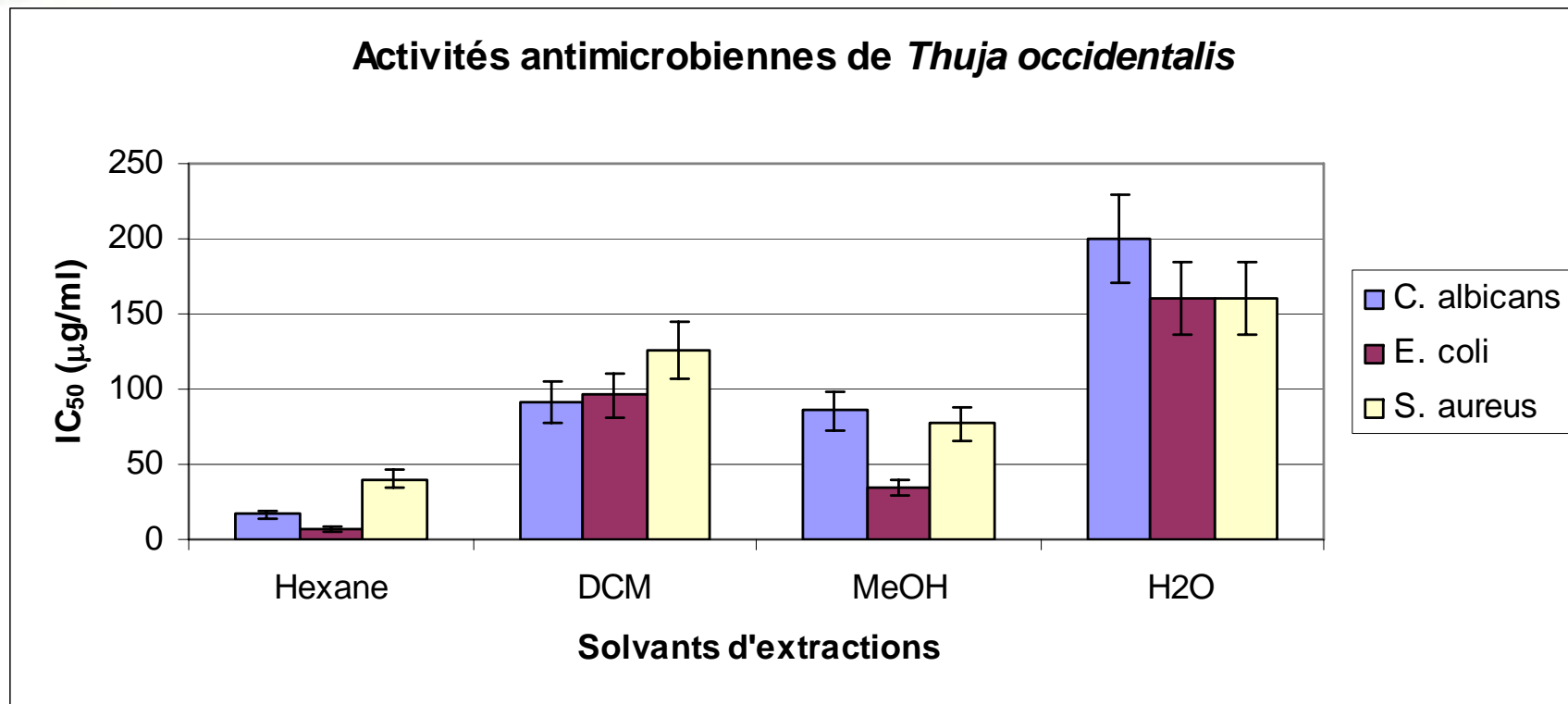


Résultats





Résultats





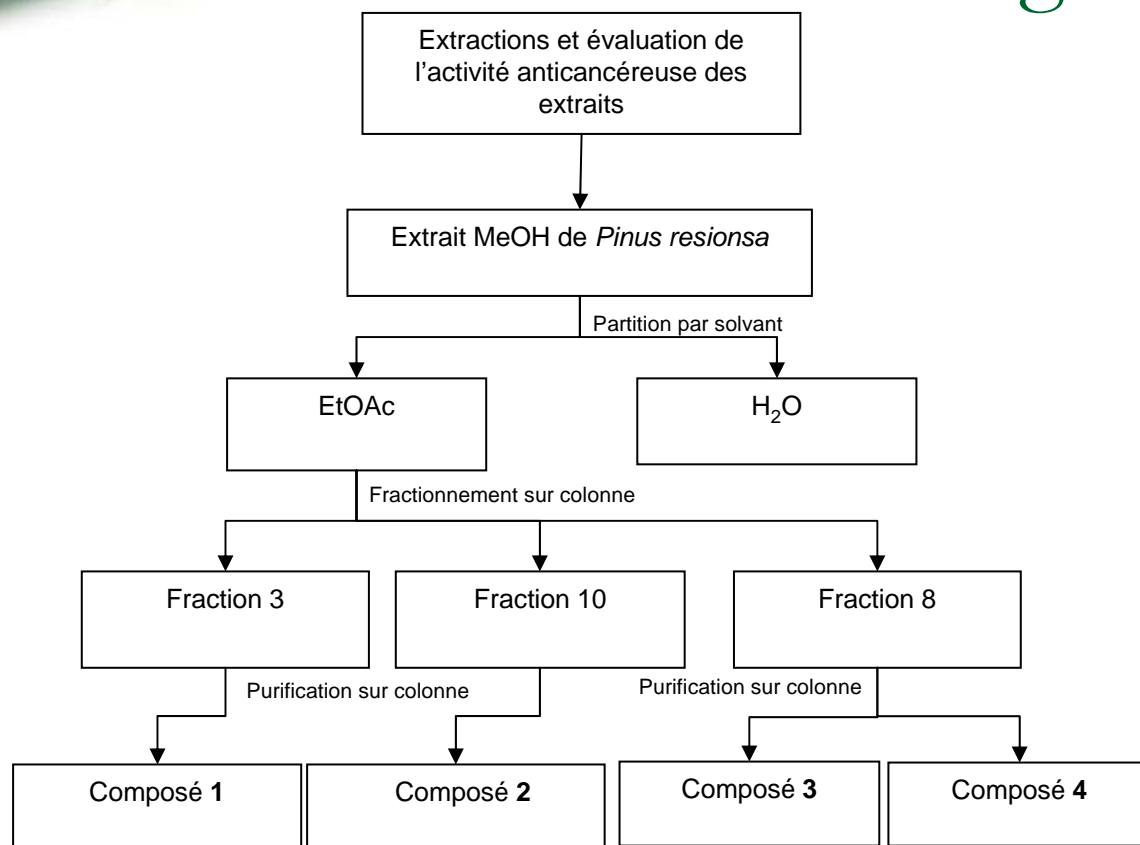
Identification des composés actifs du bois de *Pinus resinosa*: Méthodologie



- Extraction liquide-liquide
 - Fractionnement par chromatographie sur colonne
 - Purification fine des fractions actives
 - Identification des composés par différentes techniques spectroscopiques (RMN, IR, MS)
 - Évaluation de l'activité anticancéreuse des composés isolés
-



Identification des composés actifs du bois de *Pinus resinosa*: méthodologie





Résultats



- Seule la fraction EtOAc s'est montrée active après l'extraction liquide-liquide
- Cette fraction a été fractionnée par chromatographie
- Les fractions A3, A8 et A10 sont celles qui ont montré les activités les plus intéressantes

Fraction	IC ₅₀ (µg/ml)		
	A549	DLD-1	WS1
EtOAc	11 ± 1	19 ± 3	47 ± 7
Eau	> 200	> 200	> 200
A1	nd	nd	nd
A2	10 ± 1	12,4 ± 0,8	20 ± 2
A3	6,2 ± 0,3	6,6 ± 0,2	13,1 ± 0,6
A4	11,7 ± 0,9	11,7 ± 0,9	19 ± 1
A5	11 ± 1	36 ± 3	33 ± 7
A6	12 ± 2	52 ± 4	28 ± 6
A7	nd	nd	nd
A8	5,7 ± 0,6	16 ± 3	12 ± 6
A9	30 ± 4	46 ± 3	55 ± 5
A10	3,9 ± 0,1	6,8 ± 0,4	6,6 ± 0,6
A11	10 ± 1	16 ± 2	18 ± 3
A12	26 ± 2	15 ± 2	12 ± 2
A13	47 ± 5	15 ± 2	12 ± 1
A14	28 ± 5	78 ± 21	16 ± 2
A15	> 200	> 200	50 ± 30



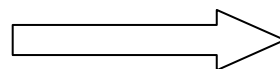
Résultats



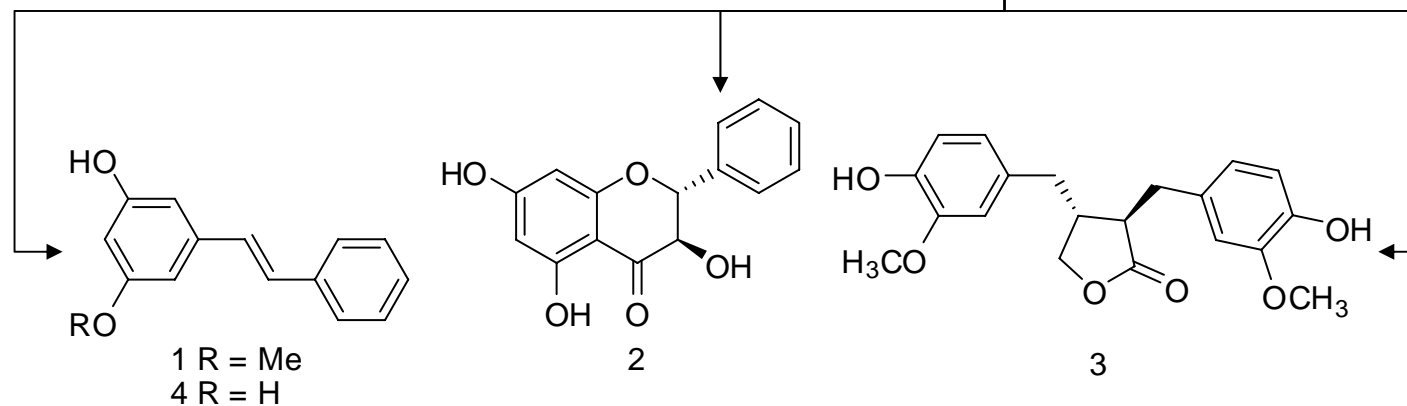
- La purification de la fraction A3 par chromatographie sur phase inverse a permis d'isoler le pinosylvin monomethyl ether
 - La purification sur gel de silice de la fraction A8 a permis d'isoler le pinobanksin et le (-)-notrachelogénine
 - Le même type de purification que pour la fraction A8 a permis d'isoler le pinosylvin de la fraction A10
-



Résultats



*Pinus resinosa*⁵



Simard, F., Legault, J., Lavoie, S., Mshvildadze, V., Pichette, A., Isolation and Identification of cytotoxic compounds from the wood of *Pinus resinosa*. *Phytotherapy research*, **2008**, published online.

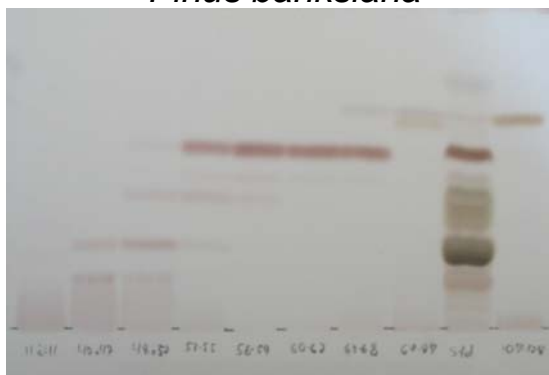
⁵Ressources naturelles Canada, www.rncan.gc.ca



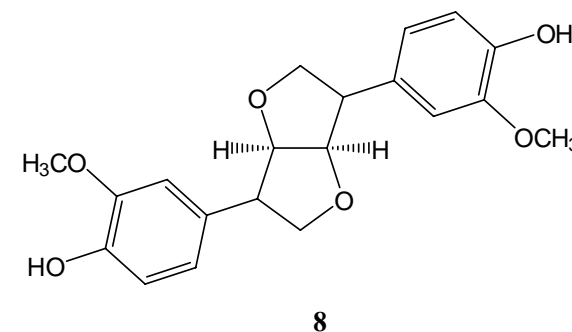
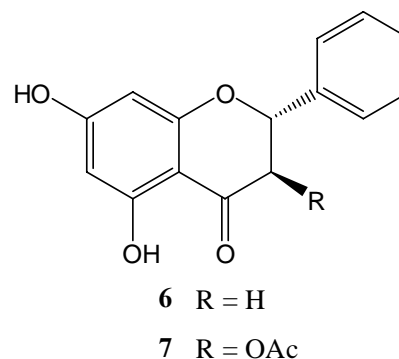
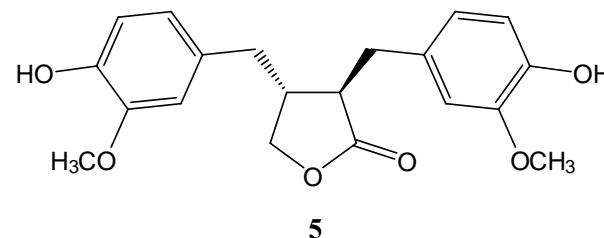
Identification des composés actifs du bois de *Pinus banksiana*: Résultats



*Pinus banksiana*⁶



Chromatographie sur couche mince



⁶NC State university, www.ces.ncsu.edu



Résultats



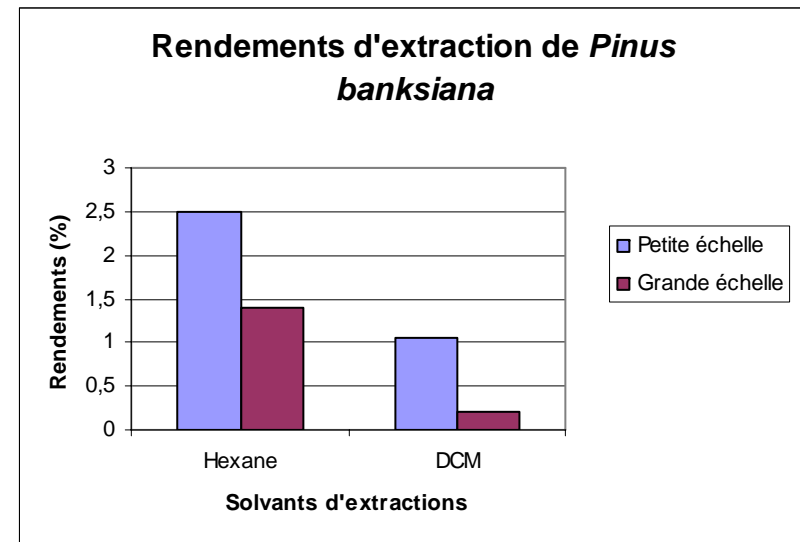
Composés	IC ₅₀ (µg/ml)		
	A549	DLD-1	WS1
Monométhyle éther de pinosylvin (1)	5,7 ± 0,9	4,5 ± 0,2	7,7 ± 0,7
Pinobanksin (2)	> 200	> 200	> 200
(-)-Nortrachelogenin (3)	28 ± 14	> 200	> 200
Pinosylvin (4)	14 ± 2	16 ± 3	15 ± 3
Pinocembrin (6)	> 200	> 200	> 200



Optimisation des méthodes d'extraction



- Mise à l'échelle du procédé d'extraction par soxhlet
 - 11 kg de bois de pin gris ont été extraits en séquence avec l'hexane et le dichlorométhane
 - Les rendements sont plus faibles que pour les extractions à petite échelle
 - Cette méthode a donc été laissée de côté

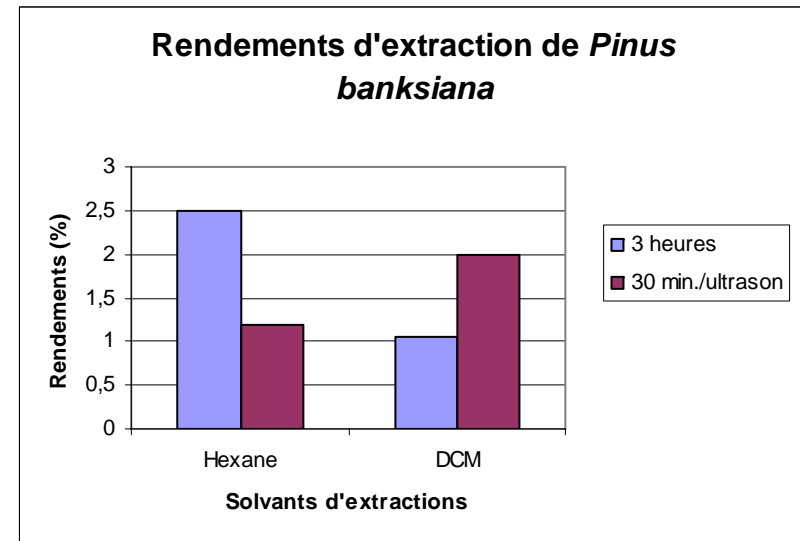




Optimisation des méthodes d'extraction



- Extraction utilisant une sonde à ultrason
 - 50 g de bois de *Pinus banksiana* dans 500 ml de solvant d'extraction
 - Les durées d'extraction sont réduites à 30 minutes
 - Le rendement est un peu plus faible pour l'hexane mais l'économie de temps présente un avantage de taille





Conclusions



- Plusieurs extraits de bois de conifères utilisés par l'industrie forestière présentent des activités anticancéreuses intéressantes (*Pinus resinosa*, *Pinus banksiana*, etc.)
 - Une approche de fractionnement guidé par la bioactivité a permis d'isoler notamment le pinosylvin monométhyl éther et le pinosylvin
 - Ces composés se sont avérés toxiques sur toutes les lignées cellulaires testées
 - L'extraction a été grandement accélérée en utilisant une sonde à ultrason
-



Remerciements



- Fonds de la recherche forestière du Saguenay-Lac-Saint-Jean-Fonds de recherche sur la nature et les technologies
- Jacques Tremblay, Scierie Thomas-Louis Tremblay
- Gilles Valade, Abitibi-Bowater
- Vakhtang Mshvildadze
- Serge Lavoie
- Charles Sirois
- Catherine Dussault
- Maxime Lebrun
- Patricia Georges

*Fonds de recherche
sur la nature
et les technologies*

Québec 
