

DEVELOPPEMENT DE VOIES DE VALORISATION POUR LES DECHETS DE BOIS DE L'INDUSTRIE DU SCIAGE ET POUR LES RESIDUS DE LA COUPE FORESTIERE

André Pichette¹, Jean Legault¹, François Simard¹, Charles Sirois, Joël Fournier², Yacine Boumghar², Jacques Tremblay³, Gilles Valade⁴

¹ Département des sciences fondamentales, U. du Québec à Chicoutimi;

² CEPROCQ, Collège Maisonneuve

³ Scierie Thomas-Louis Tremblay, Ste-Monique

⁴ Abitibi-Consolidated

1. PROBLEMATIQUE

L'exploitation de la forêt boréale a une grande importance au niveau économique et social pour le Québec et le Canada. Le secteur forestier a généré plus de 11 millions de dollars en exportation et plus de 77 000 emplois en 2004 au Québec [1]. Cette industrie a aussi généré plus de 2 millions de m³ de sciures et de planures en 2005 [1]. Ces résidus pourraient faire l'objet d'une valorisation sous forme de produits biopharmaceutiques. Une vaste revue de la littérature scientifique révèle que peu de travaux analytiques ont été effectués sur les produits naturels présents dans le bois des essences les plus utilisées par l'industrie québécoise et sur le potentiel d'utilisation de ces produits naturels dans le domaine biopharmaceutique. Nous croyons que ce potentiel est présent puisque certains travaux de recherche effectués par des chercheurs sur des espèces apparentés à celles du Québec démontrent que certains extractibles (principalement des terpènes) du bois possèdent des activités anticarcinogène (produits utiles dans la prévention des cancers) [2-4], anticancéreuses [5-7] et antibactérienne [8-9]. Ce potentiel nous a donc incité à entamer un projet de recherche visant à identifier de nouveaux agents thérapeutiques pouvant mener au développement d'une nouvelle voie de valorisation des résidus générés par l'industrie forestière.

2. OBJECTIFS PRINCIPAUX DU PROJET

Voici les principaux objectifs du projet de recherche:

- l'extraction des produits naturels des divers résidus en utilisant différentes méthodes éprouvées dans notre laboratoire telles l'hydrodistillation, l'extraction séquentielle avec des solvants de polarité croissante et l'extraction par fluides supercritiques (CO₂);
- l'évaluation des activités anticancéreuse, anticarcinogène et antibiotique des extraits sur des cultures cellulaires et l'évaluation de l'innocuité des extraits sur des cultures de cellules saines;
- l'identification des composés responsables de la bioactivité des extraits les plus prometteurs;
- l'évaluation détaillée de l'innocuité des composés bioactifs sur des cultures cellulaires (cellules saines);
- l'optimisation des méthodes d'extraction et de purification des composés bioactifs en vue d'un développement à grande échelle.

3. RESULTATS

3.1 Préparation des extraits

Les essences choisies pour cette étude étaient : le cèdre (*Thuja occidentalis*), le pin gris (*Pinus banksiana*), le pin rouge (*Pinus resinosa*), le pin blanc (*Pinus strobus*), le sapin baumier (*Abies balsamea*), le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloïdes*), le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), le bouleau blanc (*Betula papyrifera*), l'épinette noire (*Picea mariana*) et l'épinette blanche (*Picea mariana*). Le bois de ces arbres a été broyé mécaniquement puis extrait par Soxhlet pendant 24h avec des solvants de polarité croissante (approche séquentielle qui consiste à extraire le même échantillon avec plusieurs solvants). Les rendements de ces extractions, calculés par rapport à la masse de bois extrait, sont présentés au tableau 1.

3.2 Évaluation des activités biologiques

Tous les extraits obtenus à partir de ces essences d'arbres ont été testés. Deux lignées humaines de cellules cancéreuses ont été utilisées lors des tests de bioactivité : la lignée A549 (carcinome du poumon) et la lignée DLD-1 (adénocarcinome du côlon). Ces cellules, incubées dans des plaques 96 puits, ont été traitées pendant 48h avec différentes concentrations d'extraits. Par la suite, la survie cellulaire a été évaluée grâce à une sonde moléculaire, soit la résazurine. À partir des taux de survie mesurés en fonction des concentrations des extraits, l'IC₅₀, soit la concentration nécessaire pour éliminer la moitié des cellules, a pu être calculée pour chaque extrait. Ces résultats sont présentés dans le tableau 1. Aussi, d'autres lignées de cellules microbiennes ont été utilisées, soit une levure (*Candida albicans*) et deux bactéries (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*). Les résultats des activités sur ces lignées sont aussi présentés au tableau 1. Tous les extraits ont également été testés sur des cellules saines (WS1). Les extraits les plus intéressants sont ceux qui sont toxique (IC₅₀ faible) pour les cellules cancéreuses (A549 et DLD-1), tout en étant moins toxiques (IC₅₀ élevée) pour les cellules saines (WS1). D'après ces résultats, les extraits au DCM de cèdre (*T. occidentalis*), de pin gris (*P. banksiana*) et de pin blanc (*P. strobus*) ainsi que les extraits au MeOH de pin rouge (*P. resinosa*) sont les plus actifs. L'extrait de cèdre au DCM est très toxique pour les cellules cancéreuses (IC₅₀ 6-27 µg/mL), mais étant donné qu'il est aussi toxique pour les cellules saines (IC₅₀ 5,4 µg/mL), il n'a pas été choisi pour la suite de l'étude. Les trois autres extraits sont moins actifs que le cèdre mais présentent une bien meilleure sélectivité. Par exemple, l'extrait au MeOH du pin rouge (*P. resinosa*) présente une activité moyenne sur les cellules cancéreuses (IC₅₀ 19-26 µg/mL) et faible sur les cellules saines (IC₅₀ 53 µg/mL). À ce titre, l'extrait le moins actif et le moins sélectif parmi les trois ciblés est celui du pin blanc (*P. strobus*), qui est d'ailleurs celui qui offre le plus faible rendement (1.0 %). Nous avons donc choisi d'identifier les produits responsables de l'activité anticancéreuse dans les extraits suivants : pin gris (*P. banksiana*) au DCM et pin rouge (*P. resinosa*) au MeOH

Tableau 1 : Rendement d'extraction et activité biologique des extraits

Espèce	Solvant	Rendement	IC ₅₀ anticancéreux (µg/mL)			IC ₅₀ antimicrobien (µg/mL)		
			A549	DLD-1	WS1	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>T. occidentalis</i>	Hexane	1,87%	96 ± 9	46 ± 3	23 ± 2	17 ± 3	6,8 ± 0,7	40 ± 5
<i>T. occidentalis</i>	DCM	0,81%	27 ± 2	6,1 ± 0,7	5,4 ± 0,8	91 ± *	96 ± 15	126 ± 50
<i>T. occidentalis</i>	MeOH	3,92%	84 ± 7	26 ± 2	32 ± 4	86 ± *	34 ± 3	77 ± 6
<i>T. occidentalis</i>	H ₂ O	0,29%	nd	nd	nd	> 200	> 160	> 160
<i>P. banksiana</i>	Hexane	2,50%	84 ± 6	97 ± 4	110 ± 7	> 200	> 160	58 ± 15
<i>P. banksiana</i>	DCM	1,05%	24 ± 2	28 ± 2	56 ± 3	> 200	> 160	150 ± 25
<i>P. banksiana</i>	MeOH	1,22%	62 ± 5	60 ± 3	88 ± 3	55 ± 3	111 ± 9	50 ± 1
<i>P. banksiana</i>	H ₂ O	0,39%	nd	143 ± 7	190 ± 10	> 200	> 160	> 160
<i>P. resinosa</i>	Hexane	5,20%	nd	143 ± 7	190 ± 10	nd	nd	nd
<i>P. resinosa</i>	DCM	0,25%	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. resinosa</i>	MeOH	1,10%	19 ± 3	26 ± 3	53 ± 5	nd	nd	nd
<i>P. resinosa</i>	H ₂ O	0,41%	41 ± 6	47 ± 4	130 ± 10	nd	nd	nd
<i>P. strobus</i>	Hexane	6,90%	116 ± 9	123 ± 6	138 ± 5	nd	nd	nd
<i>P. strobus</i>	DCM	1,00%	38 ± 3	49 ± 5	71 ± 3	nd	nd	nd
<i>P. strobus</i>	MeOH	2,20%	nd	nd	400 ± 10	nd	nd	nd
<i>P. strobus</i>	H ₂ O	0,41%	nd	143 ± 7	190 ± 10	nd	nd	nd
<i>A. balsamea</i>	Hexane	0,42%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	134 ± 15
<i>A. balsamea</i>	DCM	0,52%	104 ± 9	88 ± 4	53 ± 3	> 200	> 160	134 ± 7
<i>A. balsamea</i>	MeOH	2,72%	> 200	189 ± 1	40 ± 8	> 200	> 160	> 160
<i>A. balsamea</i>	H ₂ O	0,91%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>P. tremuloides</i>	Hexane	4,04%	121 ± 40	175 ± *	138 ± 6	> 200	> 160	79 ± 19
<i>P. tremuloides</i>	DCM	0,60%	97 ± 10	63 ± 2	55 ± 1	> 200	> 160	85 ± 4
<i>P. tremuloides</i>	MeOH	6,55%	> 200	134 ± 5	31 ± 3	> 200	> 160	> 160
<i>P. tremuloides</i>	H ₂ O	1,83%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>B. alleghaniensis</i>	Hexane	0,31%	98 ± 9	90 ± 3	80 ± 3	> 200	> 160	103 ± 22
<i>B. alleghaniensis</i>	DCM	0,15%	101 ± 11	61 ± 3	53 ± 1	> 200	> 160	75 ± 10
<i>B. alleghaniensis</i>	MeOH	1,98%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>B. alleghaniensis</i>	H ₂ O	0,51%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>B. papyrifera</i>	Hexane	2,66%	> 200	85 ± 4	67 ± 3	> 200	> 160	124 ± 13
<i>B. papyrifera</i>	DCM	1,25%	149 ± 25	69 ± 3	52 ± 1	> 200	> 160	61 ± 2
<i>B. papyrifera</i>	MeOH	8,92%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>B. papyrifera</i>	H ₂ O	2,11%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>P. mariana</i>	Hexane	0,56%	124 ± 22	> 200	144 ± 12	> 200	> 160	67 ± 4
<i>P. mariana</i>	DCM	0,16%	112 ± 7	82 ± 15	56 ± 3	> 200	> 160	184 ± 20
<i>P. mariana</i>	MeOH	0,66%	> 200	85 ± 2	73 ± 5	> 200	> 160	> 160
<i>P. mariana</i>	H ₂ O	0,81%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	Hexane	0,45%	> 200	137 ± 19	70 ± 6	> 200	> 160	59 ± 2
<i>P. glauca</i>	DCM	0,34%	122 ± 15	95 ± 13	61 ± 4	> 200	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	MeOH	0,83%	> 200	95 ± 21	92 ± 2	> 200	> 160	> 160
<i>P. glauca</i>	H ₂ O	1,16%	> 200	> 200	> 200	> 200	> 160	> 160

3.3 Identification des composés actifs

L'extrait au MeOH du bois de pin rouge (*P. resinosa*) a d'abord été fractionné par extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle (EtOAc) et l'eau. Ces deux fractions ont ensuite été soumises aux tests d'activité anticancéreuse. Comme la fraction EtOAc s'est montrée la seule active, elle a été fractionnée par chromatographie liquide sur gel de silice en utilisant un gradient

de solvant (du chloroforme au méthanol). Quinze fractions (A1 à A15) ont été obtenues par cette méthode de fractionnement et ont été testées pour leur activité anticancéreuse.

Tableau 2 : IC₅₀ des fractions de l'extrait au MeOH du bois de pin rouge (*P. resinosa*)

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

Nous pouvons constater que les fractions A3, A8 et A10 sont les plus intéressantes en raison de leur IC₅₀ basse pour les cellules cancéreuses. Des travaux de séparations fines et d'identification des produits bioactifs ont donc été effectués à partir de ces fractions (figure 1). L'échantillon A3 a été purifié par chromatographie sur phase inverse avec du méthanol 70% pour obtenir le monométhyle éther de pinosylvin (**1**). La fraction A8 a permis l'isolation du pinobanksin (**2**) et du (-)-nortrachelogenin (**3**) par chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'hexane et d'acétate d'éthyle. De la même façon, il a été possible d'isoler le pinosylvin (**4**) à partir de la fraction A10.

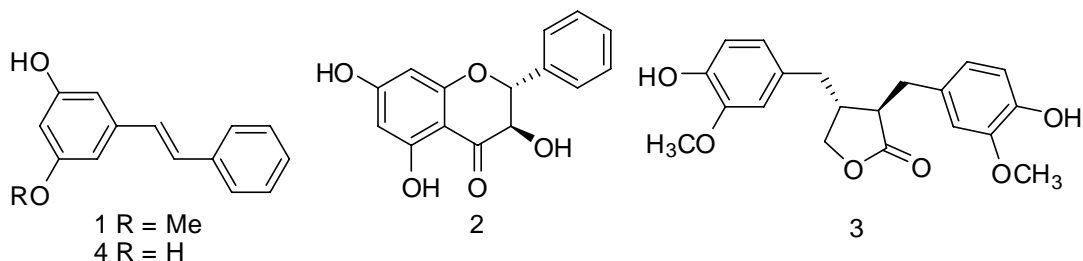


Figure 1 : Molécules isolées dans l'extrait au MeOH du bois de pin rouge (*P. resinosa*)

Grâce à un fractionnement guidé par la bioactivité similaire au précédent, il a été possible d'isoler et d'identifier cinq composés (figure 2) dans l'extrait au DCM du bois de pin gris (*P. banksiana*). Ces composés sont le matairésinol (**5**), le pinocembrin (**6**), l'acétate de pinobanksin (**7**), le pinobanksin (**2**) et le pinorésinol (**8**). Il est à noter que les composés **5** et **8** appartiennent à la famille des lignanes tandis que les composés **2**, **6** et **7** sont de la famille des flavonoïdes.

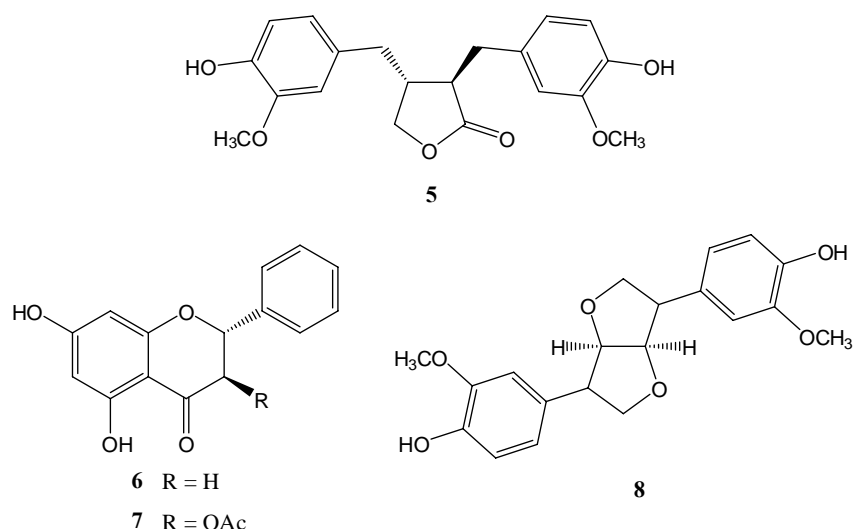


Figure 2 : Molécules isolées dans l'extrait au DCM du bois de pin gris (*P. banksiana*)

Ces composés ont été identifiés grâce à plusieurs techniques spectroscopiques (RMN, IR, MS). Les données recueillies ont été comparées avec celle de la littérature.

3.4 Innocuité des composés identifiés

Les composés isolés en quantité suffisante ont été soumis à des tests d'activité anticancéreuse. En parallèle, les mêmes composés ont été mis en contact avec des cellules saines afin d'évaluer leur toxicité. Les résultats de ces tests sont présentés au tableau 3.

Tableau 3 : Antivité anticancéreuse des composés isolés

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

À la lumière de ces résultats, deux composés, le monométhyle éther de pinosylvin (1) et le pinosylvin (4), ont démontré une activité anticancéreuse évidente. Malheureusement, l'activité sur les cellules saines étant comparable, aucun de ces composés ne pourra faire l'objet d'un développement pré-clinique élaboré. Il est bon de mentionner que ces deux composés ont été isolés à partir du bois de pin rouge (*P. resinosa*). Comme ces molécules étaient présentes en très faibles concentrations dans l'extrait méthanolique, ils ne peuvent expliquer à eux seuls l'activité anticancéreuse observée.

Le seul composé isolé à partir du bois de pin gris (*P. banksiana*) qui a pu être testé pour son activité anticancéreuse est le pinocembrin (6). Celui-ci s'est avéré inactif autant sur les cellules cancéreuses que sur les cellules saines. Ainsi, aucun des composés responsables de la bioactivité de l'extrait de bois de pin gris n'a été identifié.

3.5 Optimisation des méthodes d'extraction

Deux approches ont été évaluées afin d'optimiser l'extraction. D'abord, une mise à l'échelle du procédé d'extraction par Soxhlet a été réalisée. Ainsi, 11 kg de bois de pin gris (*P. banksiana*) ont été extraits en séquence avec l'hexane et le dichlorométhane. Les rendements d'extractions sont beaucoup plus faibles (1,4 % avec l'hexane et 0,2 % avec le DCM) que pour les expériences précédentes (voir en comparaison le tableau 1. Cette approche n'a donc pas été poursuivie.

La deuxième méthode d'extraction implique l'utilisation d'une sonde à ultrason. Ainsi, 50 g de bois de pin gris (*P. banksiana*) mélangés à 500 mL de solvant ont été soumis à l'action d'une sonde à ultrason. Bien que l'extraction a été effectuée pendant seulement 30 minutes, de très bons rendements ont été obtenus (1,2 % avec l'hexane et 2,0 % avec le DCM). Même si le rendement pour l'extraction à l'hexane est légèrement inférieur avec la technique des ultrasons, l'économie de temps est tellement considérable que cette technique présente un avantage de taille.

4. CONCLUSION

Au cours de ce projet de recherche, il a été démontré que des extraits de bois de conifères présentent des activités anticancéreuses intéressantes. Par une approche de fractionnement guidée par la bioactivité, certains composés ont pu être isolés, notamment, le monométhyle éther de pinosylvin (1) et le pinosylvin (4) qui se sont avérés cytotoxiques sur tous les lignées cellulaires testées. Finalement, le processus d'extraction a été grandement accéléré en utilisant une sonde à ultrason.

5. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ressources et industries forestières. Portrait statistique, édition 2007, Ministère des ressources naturelles et de la faune. Disponible à [http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/stat_edition_complexe/complexe.pdf], visité le 01 avril 2008. [2] Chang, L. C. *et al.* Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63(9), 1235-1238. [3] Iwamoto, M. *et al.* Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. *Planta Med.*, **2003**, 69(1), 69-72. [4] Ohtsu, H. *et al.* Anti-tumor-promoting rearranged abietane diterpenes from leaves of *Larix kaempferi*. *Planta Med.*, **1999**, 65, 664-666. [5] Ahsan, M. *et al.* Cytotoxic diterpenes from *Scoparia dulcis*. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66(7), 958-961. [6] Sommit, D. *et al.* Cytotoxic activity of natural labdanes and their semi-synthetic modified derivatives from *Croton oblongifolius*. *Planta Med.*, **2003**, 69(2), 167-170. [7] Marques, C.G. *et al.* Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the growth of human cancer cell lines. *Planta Med.*, **2002**, 68(9), 839-840. [8] Simard, F. Isolation d'un composé diterpénique tricyclique, rapport de projet, été 2003, 32 pages. [9] Ulubelen, A. *et al.* Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia viridis*. *Planta Med.*, **2000**, 66, 458-462. [10] Savluchinske, F.S. *et al.* Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *J. Microbiol. Methods*, **1999**, 35(3), 201-206