

MCours.com

CHAPITRE V

ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

5. État d'avancement du projet

5.1 Introduction

Plusieurs espèces de la forêt boréale ont été rapportées dans la littérature pour des applications anti-inflammatoires en médecine traditionnelle amérindienne. Les principales espèces utilisées étaient *Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Ledum groenlandicum*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pinus banksiana*, *Populus balsamifera*, *Populus tremuloides*, *Solidago canadensis*, *Vaccinium angustifolium* et *Vaccinium myrtilloides* (Moerman, 2000). Ces espèces ont fait l'objet d'un criblage afin d'évaluer leur activité anti-inflammatoire dans le but de traiter des malaises associés à cette réaction de défense immunitaire. Les activités antioxydante et anti-cancéreuse ont également été évaluées afin de maximiser les retombées de cette étude.

5.2 Préparation des espèces végétales

Les espèces sélectionnées (Moerman, 2000) ont d'abord été récoltées (Tableau 2), triées, séchées à l'air libre et broyées. Chaque matrice végétale a ensuite été extraite par Soxhlet avec du méthanol (350 mL). Chaque extrait a été évaporé sous pression réduite et séché sous vide.

Tableau 2. Données relatives à la récolte des espèces sélectionnées

| Espèce | Partie | Endroit | Date |
|---|--------------------|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller | aiguilles | Réserve faunique des Laurentides | 12 juillet 2003 |
| | branches | | |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch. | aiguilles | Réserve faunique des Laurentides | 20 septembre 2004 |
| | branches | | |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Ledum groenlandicum</i> Oeder | feuilles | St-Félicien | 26 septembre 2004 |
| | tiges | | |
| | racines | | |
| <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss | aiguilles | St-Félicien | 26 septembre 2004 |
| | branches | | |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg | aiguilles | Réserve faunique des Laurentides | 12 juillet 2003 |
| | branches | | |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Pinus banksiana</i> Lambert | cônes | Réserve faunique des Laurentides | 14 octobre 2004 |
| | aiguilles | | |
| | branches | | |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| <i>Populus balsamifera</i> Linné | branches | Réserve faunique des Laurentides | 20 septembre 2004 |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Populus tremuloides</i> Michaux | branches | Réserve faunique des Laurentides | 20 septembre 2004 |
| | tronc avec écorces | | |
| | écorces | | |
| | racines | | |
| <i>Solidago canadensis</i> Linné | fleurs | Laterrière | 28 août 2003 |
| | feuilles | | |
| | tiges | | |
| <i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton | tiges | St-Félicien | 26 septembre 2004 |
| | racines | | |
| <i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux | tiges | St-Félicien | 26 septembre 2004 |
| | racines | | |

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été faite en fonction du pouvoir d'inhibition sur la production d'oxyde nitrique de macrophages activés (Green et al., 1990). La concentration maximale sans cytotoxicité sur les macrophages a d'abord été établie pour chaque extrait afin de pouvoir évaluer la production réelle d'oxyde nitrique des macrophages activés. Cette évaluation a été réalisée selon la méthode de réduction à la résazurine (O'Brien et al., 2000). La procédure expérimentale pour l'évaluation de la cytotoxicité des extraits sur les macrophages et l'activité anti-inflammatoire est présentée au chapitre IV. Plusieurs extraits ont démontré une cytotoxicité élevée. Ainsi, l'activité anti-inflammatoire de plusieurs extraits n'a pu être évaluée à des doses élevées. Les résultats sont présentés au Tableau 3. L'extrait de fleurs de *Solidago canadensis* se démarque en étant le seul à inhiber plus de 50% de la production d'oxyde nitrique et ce, à une concentration relativement faible (65 ± 3 % d'inhibition à $10.8 \mu\text{g/mL}$). L'espèce possédant l'activité anti-inflammatoire la plus intéressante est le *Solidago canadensis* et l'extrait de fleurs est le plus actif.

5.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée avec la méthode ORAC (Ou et al., 2001). La méthodologie pour cette évaluation est présentée au chapitre IV. Tel que présenté au Tableau 4, certaines espèces se démarquent en étant plus actives que la quercétine ($17 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$), un composé reconnu pour son activité antioxydante élevée (Ou et al., 2002). Il est question de *Picea mariana* (aiguilles ($28 \pm 5 \mu\text{mol TE/mg}$), branches ($21 \pm 5 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($34 \pm 8 \mu\text{mol TE/mg}$), écorces ($40 \pm 4 \mu\text{mol TE/mg}$) et racines ($60 \pm 20 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Ledum groenlandicum* (feuilles ($25 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$), tiges ($46 \pm 8 \mu\text{mol TE/mg}$) et racines ($44 \pm 7 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Abies balsamea* (racines ($42 \pm 3 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Picea glauca* (branches ($21 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($27 \pm 1 \mu\text{mol TE/mg}$) et écorces ($34 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Larix laricina* (branches ($26 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$), tronc avec écorces ($19 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$) et écorces ($26 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$)), *Vaccinium myrtilloides* (racines ($25.0 \pm 0.5 \mu\text{mol TE/mg}$)) et *Pinus banksiana* (cônes ($22 \pm 4 \mu\text{mol TE/mg}$)). Tous les extraits de *Ledum groenlandicum* et de *Picea mariana* possèdent une activité supérieure à celle observée pour la quercétine, il s'agit donc d'espèces très intéressantes au niveau antioxydant. Les résultats obtenus avec les feuilles et les tiges du *Ledum groenlandicum* sont rapportés dans un article publié dans *Journal of Ethnopharmacology* (Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 22-28).

5.3.3 Évaluation de l'activité anticancéreuse

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits a été évaluée sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, un carcinome du poumon (A-549) et un adénocarcinome du colon (DLD-1). La cytotoxicité des extraits a également été testée sur des fibroblastes humains normaux (WS1) afin d'évaluer les impacts sur des cellules saines (Tableau 5). L'activité anticancéreuse a été évaluée *in vitro* selon le test de réduction à la résazurine (O'brien et al., 2000). La procédure expérimentale pour l'évaluation de l'activité anticancéreuse est présentée au chapitre III. Selon les critères du National Cancer Institute, un extrait est considéré actif lorsque son IC_{50} est inférieure à 100 $\mu\text{g/mL}$ (Boyd, 1997). Parmi tous les extraits testés, les racines de *Pinus banksiana* (A-549: $50 \pm 4 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $42 \pm 3 \mu\text{g/mL}$; WS1: $46 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), les écorces d'*Abies balsamea* (A-549: $88 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $92 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; WS1: $70 \pm 8 \mu\text{g/mL}$) et le tronc avec écorces de *Larix laricina* (A-549: $112 \pm 9 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $96 \pm 13 \mu\text{g/mL}$; WS1: $105 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) sont les extraits qui possèdent les activités les plus intéressantes. Cependant, ces IC_{50} sont élevées par rapport aux résultats obtenus avec l'étoposide (A-549: $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $4.8 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$) et le 5-fluorouracil (A-549: $4.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$; DLD-1: $11 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), des anticancéreux reconnus.

5.4 Résultats

Tableau 3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'espèces de la forêt boréale.

| Espèce | Partie | Concentration maximale sans cytotoxicité sur les macrophages ($\mu\text{g/mL}$) | Inhibition NO à la concentration maximale (%) ^a |
|---|--------------------|---|--|
| <i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller | aiguilles | 1.4 | 8 \pm 2 |
| | branches | 2.7 | 12 \pm 1 |
| | tronc avec écorces | 4.7 | 13.7 \pm 0.3 |
| | écorces | 2.6 | 8 \pm 2 |
| | racines | 13.0 | 2 \pm 1 |
| <i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch. | aiguilles | 2.7 | inactif |
| | branches | 2.6 | 18 \pm 1 |
| | tronc avec écorces | 5.0 | 26.9 \pm 0.5 |
| | écorces | 2.5 | 28 \pm 1 |
| | racines | 98.5 | 9 \pm 1 |
| <i>Ledum groenlandicum</i> Oeder | feuilles | 97.9 | 13 \pm 1 |
| | tiges | 98.6 | 8 \pm 1 |
| | racines | 195.6 | inactif |
| <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss | aiguilles | 1.4 | inactif |
| | branches | 4.8 | 35 \pm 1 |
| | tronc avec écorces | 4.7 | 39 \pm 1 |
| | écorces | 5.0 | 18 \pm 1 |
| <i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg | aiguilles | 2.2 | 6 \pm 2 |
| | branches | 2.3 | inactif |
| | tronc avec écorces | 2.7 | 10.5 \pm 0.5 |
| | écorces | 5.4 | 11 \pm 3 |
| | racines | 50.0 | 18 \pm 1 |
| <i>Pinus banksiana</i> Lambert | cônes | 2.5 | 29 \pm 1 |
| | aiguilles | 4.7 | 37.5 \pm 0.5 |
| | branches | 1.3 | 10.6 \pm 0.5 |
| | tronc avec écorces | 1.3 | 8 \pm 1 |
| | écorces | 2.5 | 20 \pm 1 |
| | racines | 13.0 | inactif |
| <i>Populus balsamifera</i> Linné | branches | 13.0 | 3 \pm 1 |
| | tronc avec écorces | 13.0 | inactif |
| | écorces | 6.0 | 10 \pm 2 |
| | racines | 12.0 | 6 \pm 3 |
| <i>Populus tremuloides</i> Michaux | branches | 13.0 | 4 \pm 1 |
| | tronc avec écorces | 13.0 | inactif |
| | écorces | 6.0 | 6 \pm 2 |
| | racines | 12.0 | inactif |
| <i>Solidago canadensis</i> Linné | fleurs | 10.8 | 65 \pm 3 |
| | feuilles | 13.0 | 4 \pm 2 |
| | tiges | 111.0 | 21 \pm 1 |
| <i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton | tiges | 195.2 | inactif |
| | racines | 51.0 | 13 \pm 1 |
| <i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux | tiges | 25.0 | 8 \pm 3 |
| | racines | 199.5 | inactif |

NO : Nitric oxide

^a Moyenne de trois déterminations \pm déviation standard.

Tableau 4. Évaluation de l'activité antioxydante d'espèces de la forêt boréale.

| Espèce | Partie | ORAC _{FL} ($\mu\text{mol TE/mg}$) ^a |
|---|--------------------|--|
| <i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller | aiguilles | 9 ± 3 |
| | branches | 7 ± 1 |
| | tronc avec écorces | 9.6 ± 0.5 |
| | écorces | 3.4 ± 0.5 |
| | racines | 42 ± 3 |
| <i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch. | aiguilles | 8.4 ± 0.9 |
| | branches | 26 ± 2 |
| | tronc avec écorces | 19 ± 2 |
| | écorces | 26 ± 2 |
| | racines | 10 ± 2 |
| <i>Ledum groenlandicum</i> Oeder | feuilles | 25 ± 1 |
| | tiges | 46 ± 8 |
| | racines | 44 ± 7 |
| <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss | aiguilles | 13.9 ± 0.3 |
| | branches | 21 ± 1 |
| | tronc avec écorces | 27 ± 1 |
| | écorces | 34 ± 2 |
| | racines | 11 ± 1 |
| <i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg | aiguilles | 28 ± 5 |
| | branches | 21 ± 5 |
| | tronc avec écorces | 34 ± 8 |
| | écorces | 40 ± 4 |
| | racines | 60 ± 20 |
| <i>Pinus banksiana</i> Lambert | cônes | 22 ± 4 |
| | aiguilles | 9.1 ± 0.9 |
| | branches | 6.7 ± 0.8 |
| | tronc avec écorces | 9.7 ± 0.8 |
| | écorces | n.d. |
| | racines | 11 ± 1 |
| <i>Populus balsamifera</i> Linné | branches | 6.9 ± 0.8 |
| | tronc avec écorces | 5.4 ± 0.4 |
| | écorces | 10 ± 1 |
| | racines | 4.3 ± 0.6 |
| <i>Populus tremuloides</i> Michaux | branches | 9.8 ± 0.8 |
| | tronc avec écorces | 5.1 ± 0.3 |
| | écorces | 6.0 ± 0.5 |
| | racines | 7.8 ± 0.8 |
| <i>Solidago canadensis</i> Linné | fleurs | 2.7 ± 0.9 |
| | feuilles | 10.0 ± 0.2 |
| | tiges | 3.6 ± 0.8 |
| <i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton | tiges | 8 ± 1 |
| | racines | 5 ± 1 |
| <i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux | tiges | 6.3 ± 0.8 |
| | racines | 25.0 ± 0.5 |
| Quercétine | | 17 ± 2 |

ORAC : Oxygen radical antioxidant activity; TE : Trolox equivalents; n.d.: non déterminé.

^a Moyenne de trois déterminations ± déviation standard.

Tableau 5. Évaluation de l'activité anticancéreuse d'espèces de la forêt boréale.

| Espèce | Partie | IC ₅₀ (µg/mL) ^a | | |
|---|--------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|
| | | A-549 | DLD-1 | WS1 |
| <i>Abies balsamea</i> (Linné) P. Miller | aiguilles | inactif | inactif | inactif |
| | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | 88 ± 9 | 92 ± 9 | 70 ± 8 |
| | racines | inactif | inactif | 55 ± 3 |
| <i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch. | aiguilles | inactif | inactif | inactif |
| | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | 112 ± 9 | 96 ± 13 | 105 ± 4 |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Ledum groenlandicum</i> Oeder | feuilles | inactif | inactif | inactif |
| | tiges | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss | aiguilles | inactif | inactif | inactif |
| | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Picea mariana</i> (P. Miller) Britton, Sterns & Poggenburg | aiguilles | inactif | inactif | inactif |
| | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Pinus banksiana</i> Lambert | cônes | inactif | inactif | inactif |
| | aiguilles | inactif | inactif | inactif |
| | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | 50 ± 4 | 42 ± 3 | 46 ± 3 |
| <i>Populus balsamifera</i> Linné | branches | inactif | inactif | inactif |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Populus tremuloides</i> Michaux | branches | inactif | inactif | 91 ± 7 |
| | tronc avec écorces | inactif | inactif | inactif |
| | écorces | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Solidago canadensis</i> Linné | fleurs | inactif | inactif | inactif |
| | feuilles | inactif | inactif | inactif |
| | tiges | inactif | inactif | inactif |
| <i>Vaccinium angustifolium</i> Aiton | tiges | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| <i>Vaccinium myrtilloides</i> Michaux | tiges | inactif | inactif | inactif |
| | racines | inactif | inactif | inactif |
| Étoposide | | 1.1 ± 0.1 | 4.8 ± 0.8 | - |
| 5-fluorouracil | | 4.8 ± 0.6 | 11 ± 2 | - |

^a Moyenne de trois déterminations ± déviation standard.

5.5 Conclusion

Le criblage effectué au début du projet a permis de cibler des espèces démontrant certains potentiels bioactifs. Le *Solidago canadensis* est la seule espèce possédant une activité anti-inflammatoire intéressante. Toutes les espèces étudiées ont démontré une activité antioxydante. Cependant, le *Ledum groenlandicum* et le *Picea mariana* sont les espèces les plus intéressantes. En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, les extraits d'*Abies balsamea*, de *Larix laricina* et de *Pinus banksiana* possèdent le plus de potentiel. L'ensemble des résultats démontre l'intérêt de poursuivre des recherches visant à approfondir les composés responsables de ces activités.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

6. Conclusion

L'objectif principal de ce projet de recherche visait à valoriser la biomasse de la forêt boréale notamment par l'étude du potentiel anti-inflammatoire d'extraits et de composés issus de la forêt boréale. Ainsi, des plantes potentiellement anti-inflammatoires de la forêt boréale ont été sélectionnées en se basant sur la médecine traditionnelle amérindienne. Les différentes parties (fleurs, feuilles, tiges et racines) des plantes sélectionnées ont été extraites. Les activités anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse des différents extraits ont été évaluées. Au cours de ce projet de maîtrise, il a été démontré que les fleurs de *Solidago canadensis* possèdent une activité anti-inflammatoire. De plus, les fleurs, les feuilles et les tiges de *Solidago canadensis* ont montré une activité antioxydante. Par conséquent, ces résultats supportent l'utilisation ethnopharmacologique de cette plante par les peuples ancestraux de l'Amérique du Nord. L'extrait de fleurs de *Solidago canadensis* a été sélectionné et les composés majoritaires de la fraction aqueuse ont été isolés par chromatographie et HPLC préparatif. La caractérisation par résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse a mené à l'identification de ces composés. De la sorte, cinq dérivés connus d'acide cafféoylquinique ont été isolés. Toutefois, il s'avère que ces composés ne sont pas responsables de l'activité anti-inflammatoire observée pour l'extrait. Au cours de ce projet, l'acide 3,4-di-*O*-cafféoylquinique a été rapporté pour la première fois à partir du *Solidago canadensis*. Également, les travaux de séparation ont mené à l'isolation de la quercétine et du 9 α ,16 ξ -dihydroxy-6-oxo-7,13-labdadièn-15,16-

olide (solicanolide), un nouveau diterpène de la famille des labdanes. Ce nouveau composé a démontré une activité anticancéreuse intéressante sur les lignées cellulaires A-549, DLD-1 et WS1. Cependant, les autres composés isolés se sont révélés inactifs.

Étant donné que les composés isolés dans l'extrait de fleurs du *Solidago canadensis* ne sont pas responsables de l'activité anti-inflammatoire observée pour l'extrait, il serait pertinent d'effectuer des travaux d'isolation supplémentaires. En ce qui concerne le solicanolide, le nouveau diterpène de type labdane isolé à partir du *Solidago canadensis* au cours de ce projet de maîtrise, il serait intéressant d'en isoler à nouveau afin de compléter sa caractérisation. Grâce à la méthode des esters de Mosher et la diffraction des rayons X, la stéréochimie de la fonction hydroxyle en C-16 du solicanolide pourrait être élucidée. Par ailleurs, comme une activité anticancéreuse intéressante a été observée, la cytotoxicité de ce composé pourrait être évaluée sur davantage de lignées cellulaires. Également, il serait pertinent de faire une étude plus approfondie au niveau de l'activité biologique puisqu'il s'agit d'un nouveau composé et que par conséquent, son potentiel n'a pas été évalué de manière approfondie.