

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS	v
RÉSUMÉ	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES	xiii
LISTE DES SYMBOLES	xv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le contexte actuel de l'industrie forestière au Québec	1
1.1.1 La biomasse forestière	3
1.1.2 La filière des extractibles forestiers	5
1.1.3 L'intérêt commercial des extractibles	6
1.2 Les métabolites spécialisés	7
1.2.1 Les terpènes	10
1.2.2 Les polyphénols	14
1.2.3 Les alcaloïdes	16
1.3 Le bouleau blanc sur le territoire québécois	18
1.3.1 Utilisations traditionnelles du bouleau blanc	19
1.3.2 État des connaissances des extractibles du bouleau blanc	20
1.4 Activité antimicrobienne	22
1.4.1 Les microorganismes et leurs mécanismes d'action.....	23
1.4.2 La résistance aux agents antimicrobiens	25
1.4.3 Les agents antimicrobiens naturels	27
1.5 Objectif du projet	29
CHAPITRE II	
COMPOSITION ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE <i>IN VITRO</i> D'EXTRAITS D'ÉCORCE DE <i>BETULA PAPYRIFERA</i>	31
2.1 Contribution des auteurs.....	31

2.2	Résumé de l'article.....	31
2.3	Article scientifique.....	33
	Abstract.....	33
	Graphical abstract.....	34
	Highlights	34
	Keywords.....	35
	Introduction.....	35
	Experimental.....	38
	Material and reagent	38
	Plant material and granulometric fraction.....	38
	Bark composition.....	39
	Bark extraction	39
	Thin layer chromatography method.....	40
	Microorganisms cultures.....	40
	Antimicrobial assays	41
	UPLC-QTOF-MS analysis.....	42
	Statistical analysis.....	42
	Results	43
	Granulometry, composition and extraction yields.....	43
	Metabolite profile – Thin layer chromatography.....	44
	Antimicrobial activity	45
	Characterization UPLC-QTOF-MS.....	46
	Discussion.....	48
	Granulometry, composition and extraction yields.....	48
	Antimicrobial activity	50
	Characterization of extracts.....	51
	Conclusion	55
	Acknowledgment	55
	References.....	56
	Legends.....	63
	Tables	64

Figures	69
CHAPITRE III	
DISCUSSION	71
3.1 Retour sur les résultats de recherche	72
3.2 Perspectives du projet de recherche	77
3.3 Conclusion	80
RÉFÉRENCES	82
STRUCTURE CHIMIQUE	92
SUPPLEMENTARY DATA	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 La classification des terpénoïdes basée sur le nombre d'unité d'isoprène (C ₅) dans leurs structures.....	11
1.2 Teneur moyenne de composés terpéniques (%) provenant d'extraits d'écorces de bouleaux.....	21
2.1 Antimicrobial activity of white birch bark extracts against different strains of microorganisms.....	64
2.2 Chemical composition of white birch bark water extract using UPLC-QTOF-MS analyses.....	65
2.3 Chemical composition of white birch bark methanol extract using UPLC-QTOF-MS analyses.....	67
2.4 Compounds present in water and methanol extracts of white birch bark with know antimicrobial activity as reported in the literature.....	68

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schéma de l'industrie forestière au Québec.....	2
1.2	Composants structuraux du bois.....	8
1.3	Relations entre quelques métabolites primaires et spécialisés.	9
1.4	Structure chimique de l'isoprène (C ₅).....	11
1.5	Aperçu de la biosynthèse des terpénoïdes dans les plantes.....	13
1.6	Classification des composés phénoliques.	15
1.7	Noyaux caractéristiques de différents groupes d'alcaloïdes.	17
1.8	Répartition des forêts du Québec.....	19
1.9	Mécanismes d'actions des agents antimicrobiens.	24
1.10	Principaux mécanismes génétiques conduisant à la résistance aux antimicrobiens.	27
1.11	Schéma que pourrait devenir l'industrie forestière au Québec.	30
2.1	Analysis of bark biomass.	69
2.2	Thin layer chromatography of bark extracts.	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
CAQ	Composés d'ammonium quaternaire
CE ₅₀	Concentration efficace médiane
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTC	Chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium
ERV	Entérocoque résistant à la vancomycine
FPP	Farnésyl-pyrophosphate
GC-MS	Chromatographie gazeuse liée à un spectromètre de masse
GGPP	Géranylgéranyl-pyrophosphate
GPP	Géranyl-pyrophosphate
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
INT	Chlorure d'iodonitrotétrazolium
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
MEP/DOXP	2-C-méthylérythritol-4-phosphate/1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate, la voie du méthylérythritol phosphate
MS	Métabolite spécialisé
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
PHVA	Produit à haute valeur ajoutée
PIB	Produit intérieur brute
RAM	Résistance aux agents antimicrobiens
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline

UPLC-QTOF-MS	Chromatographie liquide ultra performante liée à un spectromètre de masse à quadripôle à temps de vol
UV	Ultraviolet-visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humain

Cliccours.com

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
cfu	<i>Colony-forming unit</i>
cm	Centimètre
g	Gramme
h	Heure
kg	Kilogramme
L	Litre
m/z	Masse sur charge
mg	Milligramme
min	Minute
MJ	Mégajoule
mL	Millilitre
mm	Milimètre
N	Normalité
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène
ppm	Partie par million
psi	<i>Pound-force per square inch</i>
β	Bêta
μL	Microlitre

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le contexte actuel de l'industrie forestière au Québec

Les forêts du Québec couvrent un vaste territoire et sont caractérisés par la multitude, la variété et la richesse de leurs ressources. Sur une superficie totale de 1,7 millions km², le territoire forestier couvre 44,8 % du territoire québécois, soit 761 100 km² (Ministère des ressources naturelles, 2016). L'exploitation forestière est présente dans pratiquement toutes les régions du Québec. La disponibilité d'une importante ressource forestière a permis à ce jour le développement d'une puissante activité manufacturière, autour de la fabrication des produits du bois et de l'industrie des pâtes et papiers (Royer et al., 2012). Le secteur de la fabrication des produits du bois regroupe toutes les activités qui visent à transformer le bois en produits manufacturés, tels les panneaux traditionnels, le bois d'ingénierie et les fibres isolantes. Les scieries jouent ici un rôle central puisqu'elles effectuent un premier traitement de la ressource forestière et approvisionnent les usines de panneau et les unités de deuxième et de troisième transformation du bois (MRNF, 2012). Les produits de première transformation (bois rond, copeaux, sciures, etc.) correspondent aux éléments issus de l'usinage de la matière première qui sont récupérés pour en faire un produit fini ou semi-fini. Au contraire, les produits de deuxième et troisième transformation correspondent aux mêmes éléments, mais ayant subi des étapes de transformation supplémentaires effectuées par un ou deux établissements autres que ceux de la première transformation pour en faire un produit fini ou semi-fini (MRNFP, 2016). La Figure 1.1 présente un schéma représentatif de l'industrie forestière au Québec comprenant les différents composants du secteur ainsi que les produits du bois.

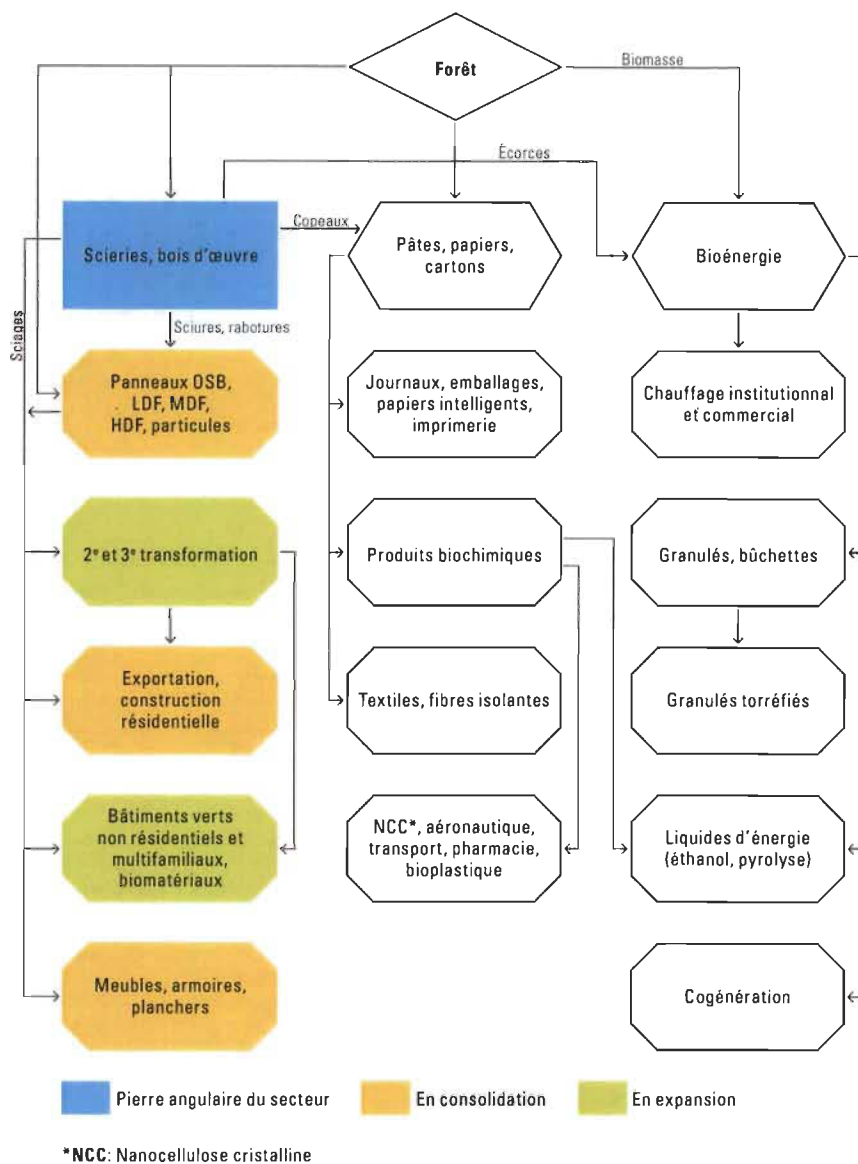


Figure 1.1 Schéma de l'industrie forestière au Québec.
Tiré de (MRNF, 2012).

Depuis le début des années 2000, l'industrie forestière canadienne vit une crise occasionnant plusieurs déficits dont une chute de prix du bois d'œuvre et du papier (Royer et al., 2012). Cette profonde mutation du secteur de la forêt est causée par une multitude de raisons dont une baisse de la disponibilité des ressources, les effets de la dernière crise économique, une réduction rapide de la demande de papier journal, papier d'impression et de papier d'écriture de même qu'une augmentation de la concurrence (MRNF, 2012). D'après les données de 2009 provenant de la Fédération des Chambres de Commerce du

Québec (FCCQ), les secteurs de la foresterie et des pâtes et papiers représentent 2,8 % du produit intérieur brute (PIB) québécois et 2,2 % de tous les emplois au Québec (Royer et al., 2010). Dans ce contexte, le ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (MRNF) a proposé la « stratégie 2012-2017 pour transformer l'industrie québécoise des produits forestiers » qui incitera l'industrie forestière à innover et s'adapter, afin que celle-ci (MRNF, 2012) :

- se diversifie pour qu'elle dépende moins d'une économie circulaire, dans le secteur de la fabrication des produits de bois ;
- développe des produits et marchés innovateurs, dans le secteur des pâtes et papiers ;
- exploite davantage les occasions d'affaires liées à la valorisation énergétique de la biomasse forestière.

Ces objectifs vont dans le même sens que la stratégie de développement industrielle du MRNF publiée en 2008, dans son livre vert « La forêt pour construire le Québec de demain », proposant d'axer l'industrie sur le développement de produits à haute valeur ajoutée (PHVA) (MRNFP, 2008). Cette optique permettra de favoriser le maintien d'une industrie innovante, créatrice de richesse et d'emplois durables (Royer et al., 2010). Suite à l'adoption de ces stratégies, il est clair que l'industrie forestière doit diversifier ses marchés pour ainsi valoriser toutes les composantes du bois, ce qui permettrait de donner un élan supplémentaire à l'industrie.

1.1.1 La biomasse forestière

Les forêts québécoises offrent un potentiel important de biomasse forestière. On estime une production annuelle de 6,4 millions de tonnes métriques anhydres en provenance des forêts privées et publiques (MRNFP, 2009). Les résidus forestiers comprennent tous les résidus de bois générés suite à la transformation du bois dans les scieries. Ceux-ci ne sont pas utilisés à la fabrication de produits finis. Les résidus forestiers peuvent prendre plusieurs formes, par exemple, ils peuvent correspondre aux souches,

houppiers, branchages, cimes, tiges. Dans l'industrie de première transformation, ce sont majoritairement les écorces qui sont retirées de l'aubier (Royer et al., 2010). Les écorces sont donc une ressource abondante sur le territoire, elles devraient être exploitées à son maximum.

Il existe différentes façons de valoriser cette biomasse forestière. La principale est la combustion de celle-ci comme source d'énergie supplémentaire. Deux méthodes de bio-combustion sont courantes soit la combustion directe générant seulement de la chaleur (chauffage de bâtiment, production d'eau chaude, chaleur pour procédés industriels) ou soit la cogénération produisant de la chaleur de même que de l'électricité (9-10 % de la production énergétique québécoise) (Royer et al., 2010). Au Québec, la récupération des résidus forestiers est au stade embryonnaire, contrairement à d'autres pays comme la majorité de l'Europe. Dans ce continent, la récupération de la biomasse forestière est commune et avantageuse en raison de la valeur élevée de l'énergie et de la courte distance séparant les sites de récupération des usagers (MRNFP, 2013). L'utilisation de la biomasse forestière québécoise présente plusieurs avantages. Premièrement, la biomasse se retrouve un peu partout sur notre territoire à de grandes quantités prévisibles de même qu'à une qualité similaire à chaque année. Deuxièmement, c'est un matériau prêt à brûler sans besoin de transformation ainsi qu'une source d'énergie efficace dont la dépense en énergie de la récolte est assez négligeable (Royer et al., 2010). De plus, le bois possède un cycle de carbone neutre, c'est-à-dire qu'au cours de la combustion du bois, le carbone atmosphérique préalablement extrait de l'atmosphère et séquestré dans le bois est remis en circulation dans l'air. La quantité de gaz ou de carbone libérée est semblable à celle lors de la décomposition naturelle d'un même volume de bois mort en forêt (Melillo et al., 1990). Il est donc préférable d'employer comme source d'énergie ou de chaleur les résidus de bois que des combustibles fossiles qui engendrent un apport supplémentaire de dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère (Campagna, 1996). Dans un contexte futur où une augmentation sensible du coût des combustibles fossiles et de l'électricité sera notée, la biomasse forestière résiduelle apparaît comme une solution qui permet de réduire les coûts liés à l'énergie, année après année (Royer et al., 2010).

Toutefois, l'un des inconvénients au Québec pour la valorisation de la biomasse constitue son territoire étendu. Le transport de la biomasse vers une usine de raffinage ou d'extraction de la biomasse vient augmenter le coût de la production. C'est pourquoi il est primordial de considérer la possibilité d'établir l'emplacement des usines le plus près possible de la forêt et des usines de première transformation du bois pour ainsi minimiser les coûts de transport. C'est l'une des raisons pourquoi une usine d'extractibles forestiers serait envisageable dans le secteur du Lac-Saint-Jean où plusieurs scieries et usines de cogénération y sont déjà établies.

1.1.2 La filière des extractibles forestiers

Les extractibles forestiers représentent une nouvelle source d'ingrédients actifs qui pourront être intégrés dans la formulation de divers PHVA. Les extractibles correspondent à toutes les molécules bioactives qui se trouvent dans les cellules du bois. Ces molécules sont facilement extraites à l'aide de solvants comme l'eau ou des alcools (éthanol, méthanol, etc.) (Centre québécois de valorisation des biotechnologies, 2014). Un extrait est donc constitué d'un mélange de diverses familles de molécules complexes. Plusieurs facteurs peuvent faire varier la teneur en extractible tels que la partie de l'arbre (bois, feuilles, écorces, branches, racines, etc.), l'espèce, l'âge, la saison et le lieu de récolte (Crozier et al., 2008). Ces molécules sont présentes dans chacune des parties de l'arbre, dont l'écorce. L'écorce est riche en extractible puisque cette partie protège l'arbre contre différents agresseurs externes comme le soleil, les herbivores et plusieurs autres. Il est donc facile d'extraire ces molécules à partir des écorces retirées dans les scieries (résidus forestiers). L'extraction des composés bioactifs du bois est effectuée grâce à l'utilisation de solvants organiques ou aqueux. Les techniques utilisées ne viennent pas modifier chimiquement les constituants structuraux du bois tels que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses (Royer et al., 2012). Après un processus d'extraction, il est envisageable d'envoyer les résidus vers des usines de cogénération pour qu'ils soient brûlés afin d'en générer de la chaleur et de l'énergie. Les extractibles sont ainsi exploitables sans nuire le

plus possible à l'application usuelle des résidus vers la filière énergétique et représentent nettement une valeur ajoutée à leur transformation.

1.1.3 L'intérêt commercial des extractibles

De nos jours, plusieurs raisons poussent les industries et les consommateurs à se tourner vers les produits naturels dits « bio » ou « vert ». Tandis qu'auparavant, les produits de synthèse dominaient le marché puisqu'ils sont généralement plus économiques et leur efficacité est davantage prouvée. Toutefois, certains inconvénients sont apparus au fil des années suite à l'utilisation de produits de synthèse tels que leurs effets nocifs, voir même toxiques chez certains organismes. C'est donc l'une des raisons pourquoi la popularité des produits naturels augmente considérablement. L'augmentation de plusieurs maladies comme le diabète de type 2, le cancer et l'Alzheimer incite la population à retourner à une saine alimentation et se tourner vers l'utilisation des produits de santé naturels. De plus, le gouvernement, grâce à certains groupes de pression, resserre les normes sur les ingrédients actifs permis dans la formulation de certains produits (MDELCC, 2015). Ces nouvelles normes viennent augmenter la demande d'ingrédients naturels des manufacturiers. La visibilité accrue par les médias des tendances « vertes » ainsi que l'augmentation du nombre de circuits de distribution viennent jouer un rôle dans la croissance de l'industrie des ingrédients naturels. D'un point de vue environnemental, l'utilisation de produits chimiques tels que les composés d'ammonium quaternaire (CAQ) comme agent antimicrobien dans la formulation de produits de désinfectant et d'assainissement est de plus en plus controversée en raison de leur impact environnemental (Christen et al., 2017; Tezel and Pavlostathis, 2015). Les CAQ sont des composés possédant un atome d'azote lié de façon covalente à quatre résidus, ce qui rend l'azote chargé positivement. La consommation mondiale annuelle des CAQ en 2005 a été estimée à 1,16 millions de tonnes (Uhl et al., 2005). Ces composés ont montré une toxicité aiguë sur divers organismes aquatiques, notamment les algues (CE_{50} : 5,8 mg/L), les crustacés (CE_{50} : 0,054 mg/L) et les poissons (CE_{50} : 1,1 mg/L) (Chen et al., 2014). Il est

donc primordial de développer des désinfectants plus sûrs pour l'environnement; se tourner vers les produits naturels est une option à considérer.

Les extractibles forestiers sont ainsi d'un intérêt pour plusieurs industries tels que pharmaceutique, cosmétique, sanitaire et alimentaire. Le taxol® (paclitaxel) (structure #11, ANNEXE A) est un exemple de produit pharmaceutique naturel qui est sur le marché depuis les années 90. Cet ingrédient actif a des propriétés anticancéreuses utilisé dans le traitement de différents types de cancer tels que le cancer de l'ovaire, du sein et des bronches. Il a initialement été identifié dans l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus bevifolia*), mais il est également présent dans l'if du Canada (*Taxus canadensis*) (Blay et al., 1993). Un autre exemple d'utilisation des extractibles forestiers dans l'industrie est la compagnie BioForeXtra. Pionnière au Québec, elle développe et commercialise des extraits actifs obtenus à partir de la biomasse forestière. Ces extraits sont présentement destinés au marché cosmétique/cosméceutique. Ainsi, compte tenu de l'amélioration des méthodes de criblage des molécules bioactives, les chercheurs sont mieux outillés dans le but de découvrir de nouvelles propriétés biologiques liées aux extractibles de plantes forestières.

1.2 Les métabolites spécialisés

Les arbres sont constitués d'une grande variété de molécules chimiques. Celles-ci peuvent être classées en trois grandes catégories : les composants structuraux du bois, les métabolites primaires et les métabolites spécialisé ou secondaire (MS). Les composants structuraux du bois correspondent à la lignine, la cellulose et les hémicelluloses (Figure 1.2). Ces composés contribuent à la performance mécanique du bois et permettent aux arbres d'atteindre des records de taille et de longévité dans le monde vivant (Royer et al., 2016). Il est toutefois important de noter que la classification des molécules présentes dans les plantes est non consensuelle dans certains ouvrages. En effet, les composants structuraux du bois font aussi partie des MS, car leur synthèse découle des mêmes voies de biosynthèse (Wink, 2011). Pour ce qui est des métabolites primaires, ils sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction normale de l'organisme. Ils ont généralement une fonction intrinsèque, c'est-à-dire une fonction

physiologique dans cet organisme (Hopkins, 2003). Les métabolites primaires rassemblent les lipides, les protéines et les glucides. Contrairement aux métabolites primaires, les MS ne contribuent pas directement au développement de la plante (Hopkins, 2003). Ceux-ci correspondent aux extractibles puisqu'ils sont facilement extraits des cellules du bois. Certains MS sont produits en faible quantité par la plante, mais ils peuvent toutefois avoir une forte activité biologique à faible concentration (Hopkins, 2003). Certains de ces métabolites peuvent être répandus ou limités à une famille, un genre et même une espèce de plante. On les retrouve dans les diverses parties des plantes à des moments précis de la vie. Quelques MS sont synthétisés dans tous les tissus de la plante, mais leur formation est plus souvent organe-, tissu-, cellule- et développement-spécifique (Wink, 2011). Les MS sont très proches des métabolites primaires puisqu'ils dérivent des mêmes voies de biosynthèse telles que la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie du shikimate (Figure 1.3) (Hopkins, 2003; Wink, 2011).

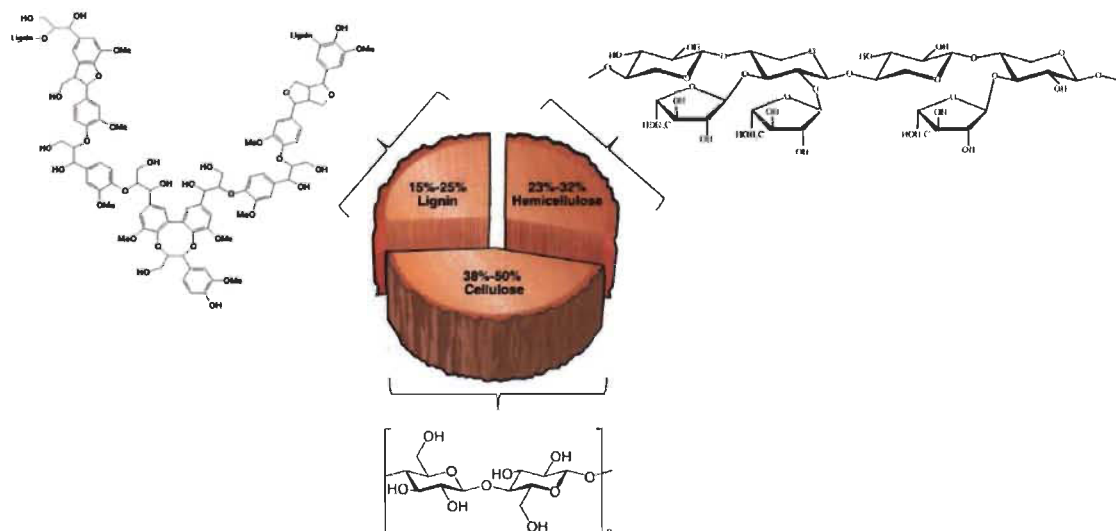


Figure 1.2 Composants structuraux du bois.
Structure d'une lignine, de la cellulose et d'un exemple d'hémicellulose : L-arabino-D-xylane. Tiré de Coma (2013).

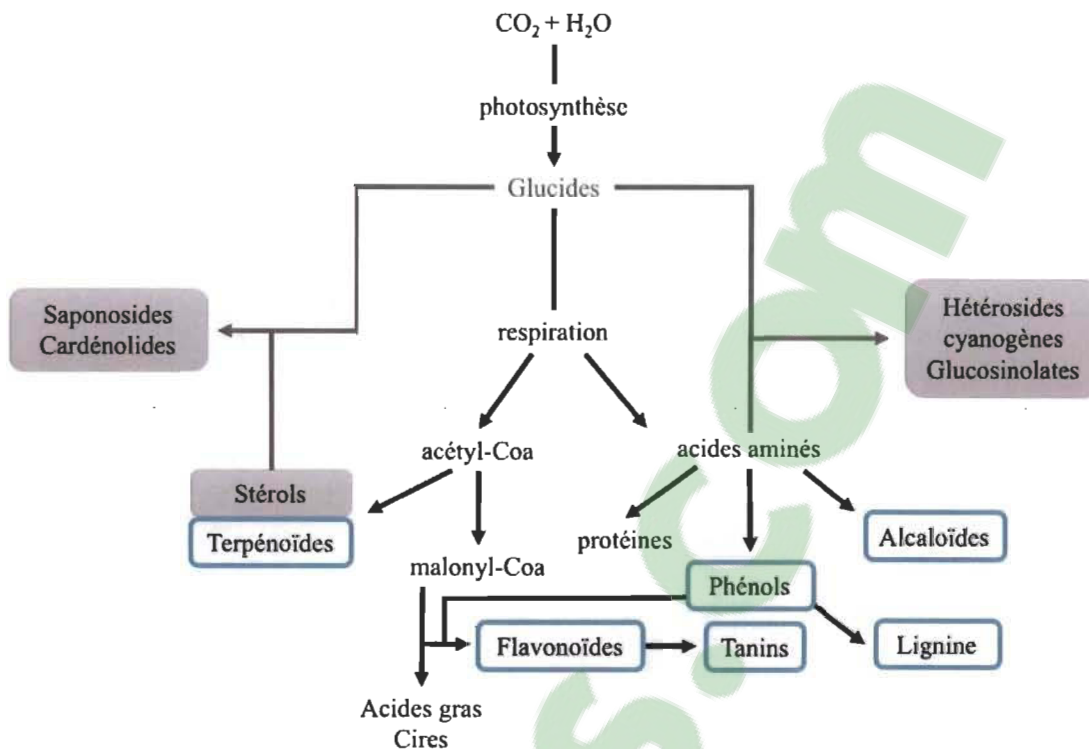


Figure 1.3 Relations entre quelques métabolites primaires et spécialisés.
Les métabolites spécialisés sont entourés en bleu. Tiré de Hopkins (2003).

À ce jour, plus de 100 000 MS ont été identifiés. De plus, on estime que chaque espèce végétale produit en moyenne plus d'une centaine de molécules différentes (Royer et al., 2012). Les MS ont différentes fonctions dans les plantes. Ils servent principalement de défense contre les herbivores, les champignons, les bactéries, les virus de même que les autres plantes qui sont en compétition pour la lumière, l'eau et les nutriments. Ils peuvent aussi avoir un rôle de signal afin d'attirer les pollinisateurs et les animaux qui peuvent disperser les graines. Ils peuvent également agir comme signaux de communication entre les plantes de même qu'avec les microorganismes en symbiose. Finalement, certains MS ont pour fonction de protéger la plante contre les rayons UV ou contre des stress physiques (Wink, 2011). Afin de remplir ces fonctions, au cours de l'évolution, les structures de ces molécules ont été synthétisées de sorte qu'elles peuvent interagir étroitement avec des cibles moléculaires dans les cellules et tissus ou avec d'autres caractéristiques physiologiques chez les animaux ou microorganismes. Souvent, les MS tentent d'imiter une réponse aux cibles moléculaires puisque leur structure

ressemble à des substrats endogènes, des hormones ou des neurotransmetteurs (Wink, 2011).

Certains MS peuvent interagir avec plus d'une cible moléculaire. Cette aptitude est avantageuse pour la plante puisque par exemple, une toxine sera plus efficace si elle interagit avec deux cibles plutôt qu'une. Dans la plupart des cas, ces métabolites sont produits sous forme de mélange de différentes classes de molécules. Par exemple, les polyphénols sont souvent accompagnés de terpénoïdes (Wink, 2011). Il sera donc plus difficile pour un herbivore ou un microorganisme de développer une résistance à ce mélange de métabolites, car une résistance concomitante à plusieurs cibles serait nécessaire. Les extractibles forestiers composés de MS sont donc intéressants pour la formulation de produits antimicrobiens puisqu'ils diminueraient les risques de résistance aux microorganismes. Ce sujet sera traité plus loin dans le texte, à la section 1.4 Activité antimicrobienne. De plus, dans un mélange, l'activité biologique des MS peut avoir un effet additif ou synergique (Wink, 2011). Dans les paragraphes suivants, les diverses propriétés des trois grandes classes de MS, les terpènes, polyphénols et alcaloïdes, seront décrites.

1.2.1 Les terpènes

Les terpènes et terpénoïdes sont la classe de MS la plus vaste et diversifiée. À ce jour, plus de 36 000 MS terpénique ont été rapportés (Buckingham, 2007). Le terme terpénoïde est utilisé pour désigner les composés dérivés des terpènes ayant un ou des groupements fonctionnels ajoutés à leur structure tels qu'un acide, alcool, cétone et plusieurs autres (Royer et al., 2012). Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq carbones. Cette unité est le 2-méthylbuta-1,3-diène ou communément appelée, l'isoprène (Figure 1.4). Les termes isoprénoïde, terpénoïde et terpène sont de nos jours interchangeables. La chimie des composés terpéniques regroupe les terpènes, les tropolones, les stérols et les taxanes (Royer et al., 2012).

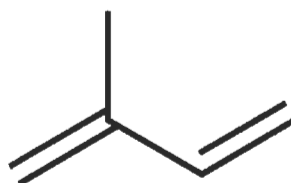


Figure 1.4 Structure chimique de l'isoprène (C₅).

La structure de certains terpènes peut être très complexe suite à la formation de structures cycliques, l'addition de fonctions comprenant de l'oxygène (O) et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules. La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments, des stéroïdes, des dérivés de stéroïdes, le latex de même qu'une grande partie des huiles essentielles (Hopkins, 2003). Ces MS peuvent être divisés en différentes classes basées sur le nombre d'unité d'isoprène qui sont présentes dans leur structure. Cette classification est détaillée dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1

La classification des terpénoïdes basée sur le nombre d'unité d'isoprène (C₅) dans leurs structures.

Nombre d'unité d'isoprène <i>n</i>	Nombre d'atome de carbone <i>n</i>	Nom
1	5	Hemiterpène
2	10	Monoterpène
3	15	Sesquiterpène
4	20	Diterpène
5	25	Sesterpène
6	30	Triterpène
8	40	Tétraterpène
9 – 30 000	> 40	Polyterpène

Tiré de Wink (2011).

Dans les espèces végétales, les terpènes peuvent avoir différentes fonctions de base tels que la croissance, le développement, la reproduction et la défense (Wink and Van Wyk, 2008). Par le fait même, plusieurs composés terpéniques peuvent être considérés

comme des métabolites primaires. Par exemple, des hormones comme l'acide abscissique et la gibbérelline, jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes (Hopkins, 2003). Par contre, la majorité des terpènes ont des fonctions de MS en agissant comme toxine ou agent de dissuasion vis-à-vis les différents parasites ou prédateurs. Il a été démontré que suite à une attaque de la plante, la concentration en composés terpénoïdes augmente considérablement (Royer et al., 2012).

Malgré la diversité des composés terpéniques, ils ont une voie commune de biosynthèse. Cette voie (Figure 1.5) comprend quatre étapes (Wink, 2011). Brièvement, la première comprend la formation de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP), l'unité C₅ d'isoprène biologique. La principale voie de synthèse de l'IPP et de son isomère allylique, diméthylallyl-pyrophosphates (DMAPP), se fait par la voie du mévalonate. Une deuxième voie de synthèse est aussi présente, la voie du méthylérythritol phosphate (MEP/DOXP). Dans la deuxième étape, les unités C₅ se condensent pour générer trois plus gros prényl-pyrophosphate (GPP, FPP et GGPP). Par la suite, dans la troisième étape, ces trois pyrophosphates subissent une large gamme de cyclisation et de réarrangement afin de produire les squelettes de carbone parents à chaque classe de terpène. La dernière étape englobe différentes oxydation, réduction, conjugaison et autres transformations qui permettent la conversion des squelettes de carbone en milliers de métaboliques terpéniques distincts.

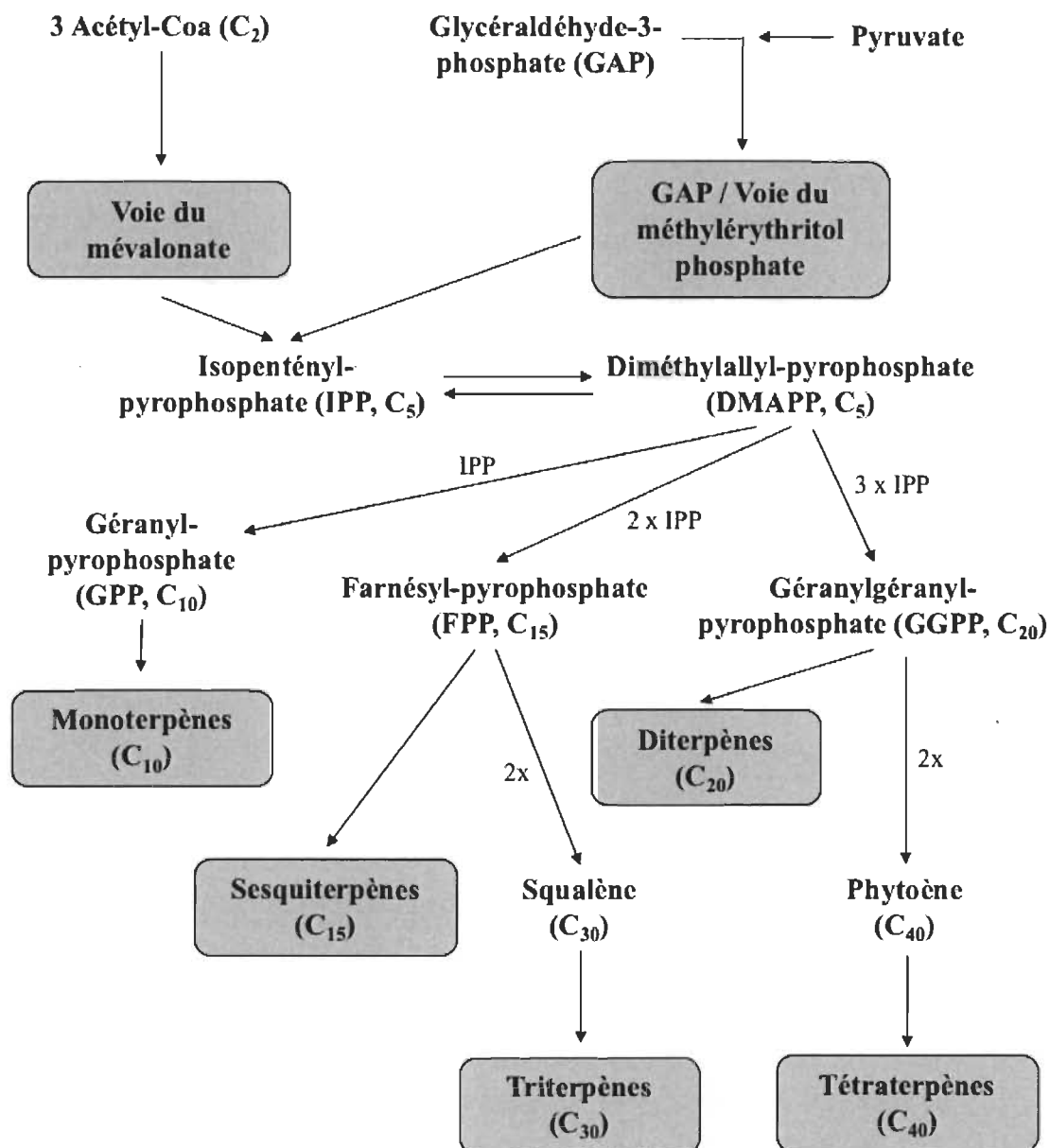


Figure 1.5 Aperçu de la biosynthèse des terpénoïdes dans les plantes.

La figure montre les étapes de base de ce processus et les principaux groupes de produits finaux. CoA : coenzyme A. Tiré de Wink (2011).

De nombreuses études ont démontré que plusieurs terpènes avaient un fort potentiel biologique (Patocka, 2003). Leurs activités biologiques sont très variées, certains MS terpéniques ont des propriétés antimicrobiennes (Inouye et al., 2001; Trombetta et al., 2005), fongicides (Hammer et al., 2003), antivirales (Özçelik et al., 2009), anti-inflammatoires (Gautam and Jachak, 2009), cytotoxiques (Sivropoulou et al., 1996),

anticancéreuses (Gould, 1997), etc. Par exemple, l'activité anticancéreuse des triterpènes extraits de l'écorce des bouleaux jaune et blanc (lupéol, bétuline et acide bétulinique) est reconnue grâce à quelques études sur le sujet (structures #7, 3, 1, ANNEXE A) (Krasutsky, 2006; Pichette et al., 2008). L'une des applications les plus courantes des MS terpéniques correspond aux huiles essentielles. Celles-ci sont constituées principalement de monoterpène, sesquiterpène et de leurs dérivés. Elles sont fortement utilisées dans l'industrie des parfums et des arômes, mais elles sont également d'un grand intérêt grâce à leurs vertus thérapeutiques (Burt, 2004; Ghabraie et al., 2016). Tel que mentionné précédemment, le taxol[®] est un autre exemple de produit pharmaceutique naturel de la famille des terpènes, extrait de l'écorce d'if du pacifique, vendu pour ses propriétés anticancéreuses. Bien que plusieurs études *in vitro* aient montré que de nombreux monoterpènes et diterpènes avaient des effets bactéricides significatifs, il n'est pas toujours facile d'obtenir la même efficacité *in vivo*. La transmission des bénéfices potentiels pour la santé humaine est donc difficile. Néanmoins, des applications telles que l'utilisation des huiles provenant d'arbres à thé pour le traitement de l'acné et le thymol (structure #12, ANNEXE A) comme agent antiseptique continuent d'avoir un succès considérable (Crozier et al., 2008).

1.2.2 Les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 composés naturels qui ont été isolés et identifiés (Vercauteren and Chèze, 1998). Ce sont les composés antioxydants les plus abondants dans notre alimentation; une consommation journalière d'environ 1 g est estimée (Royer et al., 2012). Ces composés sont divisés en une dizaine de classes chimiques présentant toutes une structure commune, un noyau benzénique (cycle aromatique à 6 carbones) lié à un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH) (Vercauteren and Chèze, 1998). Il existe de nombreuses classes de composés phénoliques : acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tannins, lignanes, stillbènes, xanthones, quinines, etc. (Royer et al., 2012). Ces structures peuvent également être acylées ou glycosylées, de même qu'elles peuvent se retrouver en monomère jusqu'au polymère, ce qui donne une grande variété de structures. La plupart des molécules

phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques; la tyrosine et la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables dans les végétaux, à partir de la voie du shikimate (Macheix et al., 2005; Wink, 2011). Dans les espèces forestières, la biosynthèse des polyphénols est étroitement liée à celle des lignines (Royer et al., 2012). Une grande quantité de ce MS se retrouve dans le bois et l'écorce des arbres.

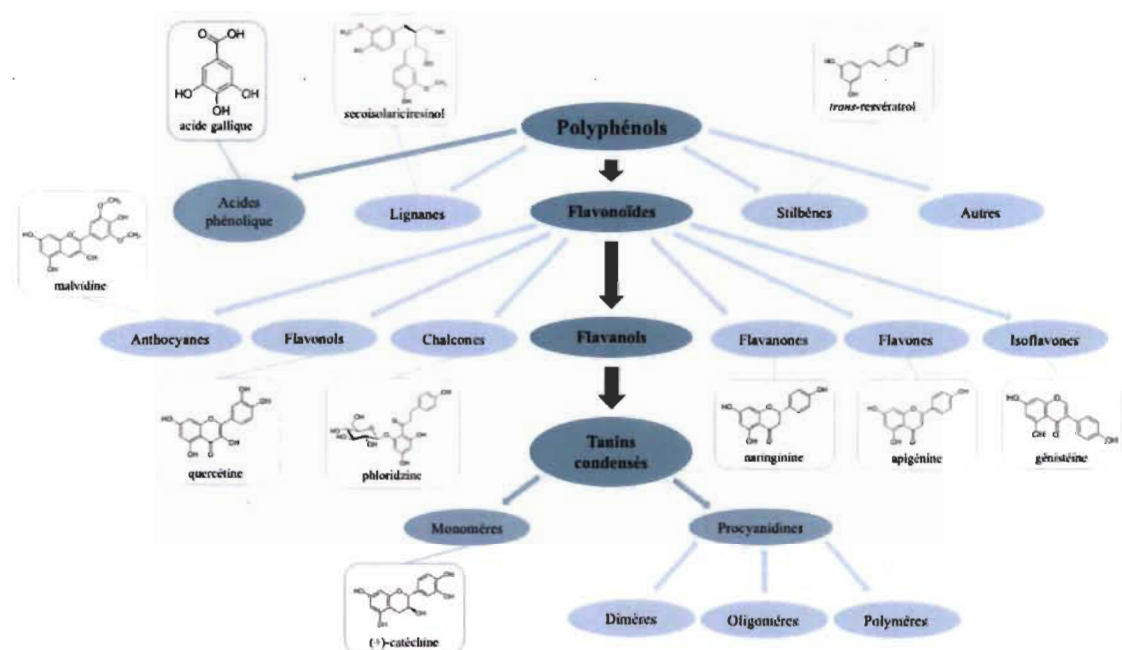


Figure 1.6 Classification des composés phénoliques.
Tiré de Zhang and Tsao (2016).

La diversité structurale des composés phénoliques explique leur riche gamme de propriétés physico-chimiques et biologiques (Figure 1.6). Leur grande réactivité chimique permet aussi de comprendre leur facilité d'interagir avec diverses molécules et ainsi d'exercer une activité biologique intéressante. Le rôle des phénols a largement été démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes cellulaires, soit comme inhibiteur ou activateur de celles-ci (Royer et al., 2012). Ces composés ont un intérêt croissant pour les nutritionnistes, l'industrie agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique de même que pour le consommateur (Stevanovic et al., 2009). Cet intérêt est dû à leurs nombreuses propriétés biologiques qu'ils procurent. Par exemple, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées telles qu'antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires,

antiallergiques, antivirales et vasodilatatrices (Arct and Pytkowska, 2008; Cushnie et al., 2007; Pietta, 2000). L'une des activités biologiques les plus étudiées des polyphénols est leur capacité à piéger les radicaux libres (capacité antioxydante) (Diouf et al., 2009; Schultz and Nicholas, 2000; Stevanovic et al., 2009). Ces MS aromatiques et colorés sont responsables du brunissement et sont impliqués dans la sensation d'astringence et d'amertume des aliments. Leur capacité antioxydante et anti-inflammatoire joue un rôle dans la prévention de certains troubles de santé tels que le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose, le cancer, l'arthrite et aussi le diabète de type II (Ammar et al., 2009; Goetz, 2007; Zhang and Tsao, 2016). Les polyphénols sont également utilisés comme principe actif de nombreux médicaments par exemple, l'acide salicylique plus connu sous le nom d'aspirine, aux propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (structure#2, ANNEXE A). En cosmétique, les oligomères procyanidoliques (OPC) isolés de pépins de raisins sont utilisés pour lutter contre le vieillissement de la peau et protéger contre l'action des rayons UV (Busserolles et al., 2006). Tous ces exemples démontrent que les composés phénoliques ont plusieurs applications utiles au quotidien du consommateur. Il est donc essentiel de s'intéresser à ceux-ci, présents en grande quantité dans les résidus forestiers (Royer et al., 2013).

1.2.3 Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde regroupe les molécules organiques hétérocycliques azotées de faibles poids moléculaires dérivées principalement d'acides aminés et présentes dans environ 20 % des espèces végétales (Crozier et al., 2008). Ce sont des composés ayant une forte activité biologique à faible dose. De ces composés, plusieurs sont davantage connus par les consommateurs telles que la morphine, la cocaïne, la quinine, la nicotine, la caféine ainsi que la codéine. À ce jour, plus de 27 000 alcaloïdes ont été caractérisés, dont 21 000 provenant de plantes (Dewick, 2009). Ceux-ci sont classés selon différents critères, dont leurs structures chimiques, leurs origines biosynthétiques ou leurs activités biologiques et écologiques (Wink, 2010). En tant que MS, il est proposé que les alcaloïdes jouent un rôle défensif dans la plante contre les herbivores et les pathogènes (Crozier et

al., 2008). Il existe plusieurs groupes d'alcaloïdes basés sur leur structure chimique tels que les tropanes, isoquinoléines, phényléthylamines, indoles, purines et plusieurs autres (Crozier et al., 2008). La Figure 1.7 montre quelques exemples de noyaux caractéristiques de plusieurs groupes d'alcaloïdes divisés selon leur structure chimique (Hesse, 2002).

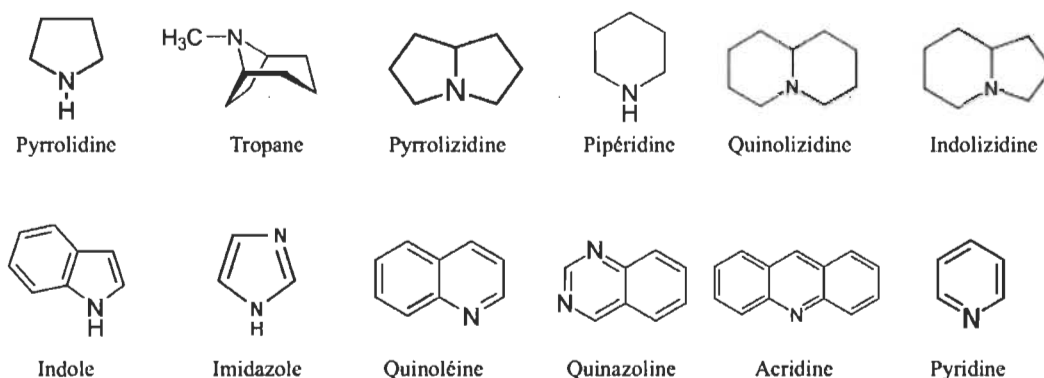


Figure 1.7 Noyaux caractéristiques de différents groupes d'alcaloïdes.
Tiré de Hesse (2002).

Des hypothèses détaillées de la biosynthèse des alcaloïdes ont été avancées suite à des études de radiomarquage. Cependant, les recherches effectuées à ce jour ne permettent pas encore de comprendre comment la plupart des alcaloïdes sont synthétisés chez les plantes, de même que leur régulation (Roberts and Wink, 1998; Wink, 2008). La majorité des alcaloïdes proviennent d'acides aminés tels que la tyrosine, la phénylalanine, l'acide anthranilique, le tryptophane, l'ornithine/arginine, la lysine, l'histidine et l'acide nicotinique (Wink, 2011). Toutefois, ils peuvent aussi dériver d'autres précurseurs tels que les purines dans le cas de la caféine, les terpénoïdes ou même être formés à partir d'acétate (Wink, 2011). Bien que les alcaloïdes soient souvent présents en petites quantités dans les plantes, ils possèdent de puissantes activités biologiques à faibles doses. Grâce à cette propriété, un grand nombre d'alcaloïdes connus ont été exploités comme produits pharmaceutiques, stimulants, narcotiques et poisons (Roberts and Wink, 1998). Certains de ces composés azotés ont une activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique et cytotoxique (Iranshahy et al., 2014; Radulović et al., 2012; Yu et al., 2005). Les alcaloïdes d'origine végétale actuellement en usage clinique comprennent les analgésiques

morphine et codéine, l'agent antinéoplasique vinblastine, la colchicine supprimeur de la goutte, les myorelaxants (+)-tubocurarine et papavérine, l'antiarythmique ajmaline et le sédatif scopolamine (Crozier et al., 2008). La plupart des alcaloïdes caractérisés à ce jour proviennent de plantes herbacées et les informations sur les alcaloïdes des arbres ligneux ou des arbustes sont rares, mais quelques études démontrent leur présence (Gerson and Kelsey, 1999; Stermitz et al., 2000).

1.3 Le bouleau blanc sur le territoire québécois

Sur le territoire canadien, on compte dix espèces de bouleau et la plupart sont indigènes à part le bouleau verruqueux qui a été introduit sur le territoire. Les espèces les plus répandues au Québec sont le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), le bouleau gris (*Betula populifolia*) et le bouleau blanc (*Betula papyrifera*). Ce dernier, aussi appelé bouleau à papier est un feuillu pouvant atteindre une trentaine de mètres de hauteur. Il est largement présent dans les forêts boréales (Figure 1.8) (Mshvildadze et al., 2007). Son bois est dur, mais peu durable puisqu'il résiste mal à l'humidité (Royer et al., 2012). Au Canada, cet arbre est exploité principalement par l'industrie forestière pour le transformer en pâte pour le papier, contreplaqué et bois de chauffage (Royer et al., 2016). Puisque la qualité du sol a une faible influence sur la croissance du bouleau blanc, il représente donc un bois bon marché du fait qu'il pousse un peu partout. Pour cette raison, il est l'un des bois de chauffage les plus courants malgré sa faible efficacité énergétique (7-11 MJ/kg) (Krasutsky, 2006). Il représente une ressource naturelle abondante et actuellement sous-utilisée (Zhao et al., 2007).

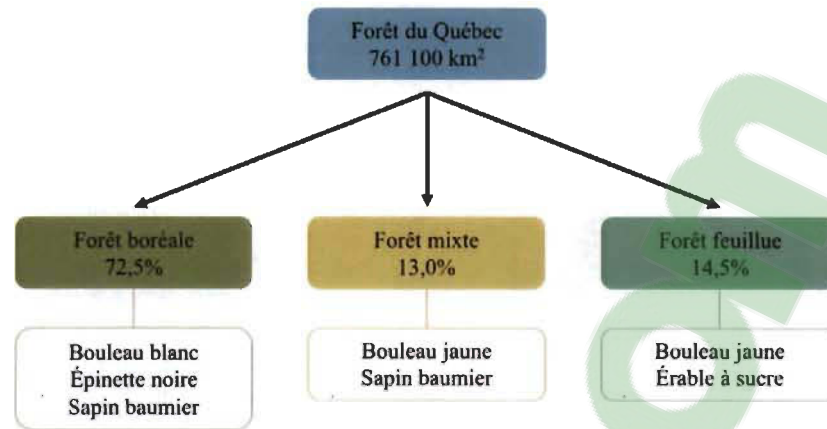


Figure 1.8 Répartition des forêts du Québec
Tiré de Royer et al. (2016).

1.3.1 Utilisations traditionnelles du bouleau blanc

Auparavant, le bouleau blanc a été utilisé par les Premières Nations en autres pour ses propriétés médicinales. Ses feuilles étaient utilisées en infusion comme tisanes contre les rhumatismes, l'hydropisie (œdème) et les calculs rénaux. Lorsque les feuilles du bouleau blanc étaient appliquées sur la peau sous forme de cataplasmes et chauffées à la vapeur, elles permettaient de traiter l'eczéma et diverses éruptions de la peau (Arnason et al., 1981). Mise à part les feuilles du bouleau blanc, l'écorce a également été employée comme agent thérapeutique par les différents peuples des Premières Nations. Par exemple, elle était utilisée comme remède contre différentes maladies liées au système digestif, tels que le dysenterie (maladie infectieuse du côlon), la diarrhée et les crampes d'estomac (Jenkins, 1939; Lacey, 1977; Smith, 1932). Autre que ses propriétés médicinales, les Amérindiens utilisaient l'écorce du bouleau blanc afin de recouvrir leurs canots puisque celle-ci est très résistante à la dégradation par les microorganismes. La sève a aussi servi pour faire du sirop pour l'alimentation (Black, 1980).

1.3.2 État des connaissances des extractibles du bouleau blanc

Chaque année, environ 230 000 tonnes d'écorce de bouleau blanc sont produites par les scieries et les usines de papier (Krasutsky et al., 2007). La majorité des produits d'extraction de cette espèce proviennent de son écorce; matériau avec un rendement d'environ 22 % en extractible (Krasutsky, 2006). Quelques études phytochimiques ont été réalisées sur le genre *Betula*, toutefois, la majorité a été effectuée sur les essences européennes. On constate donc un manque de travaux sur les espèces provenant d'Amérique (Royer et al., 2012). De plus, la majorité des études rapportées dans la littérature sur le bouleau blanc portent sur ses feuilles. Cependant, les résidus forestiers qui tentent d'être valorisés dans ce projet sont les écorces du bouleau blanc. Il est donc primordial d'enrichir les recherches en se penchant sur la caractérisation et l'identification de l'activité biologique des MS présents dans l'écorce du bouleau blanc. De façon générale, les études sur les différentes essences de bouleau montrent clairement que leurs extraits possèdent des propriétés thérapeutiques (Calliste et al., 2001; Ju et al., 2004; Willför et al., 2003). Les métabolites spécialisés qui sont retrouvés en plus grande quantité dans le genre *Betula* sont ceux de la classe des terpènes et des polyphénols (Gauthier et al., 2006; Krasutsky, 2006; Vandal et al., 2015).

En 2006, une revue de littérature portant sur les extractibles terpéniques de l'écorce des bouleaux montre que ces essences contiennent en grande partie des triterpènes et leurs dérivés (Krasutsky, 2006). De plus, elle montre que les taux d'extractibles dans les écorces de 38 espèces du genre *Betula* sont généralement similaires. Le Tableau 1.2, tiré de cette revue de littérature, met en évidence les différents triterpènes et dérivés qui ont été isolés dans l'écorce de trois espèces de bouleau, dont le bouleau blanc. Les proportions de chaque composé peuvent varier d'un arbre à l'autre à l'intérieur d'une même espèce et selon le mode d'extraction, la saison de cueillette, le site géographique ou d'autres conditions environnementales (Krasutsky, 2006).

Tableau 1.2
Teneur moyenne de composés terpéniques (%) provenant d'extraits d'écorces de bouleaux.

	<i>B. pendula</i> ^{a,d,21}	<i>B. papyrifera</i>	<i>B. neoalaskana</i>
Betulin (1)	78.1	72.4	68.1
Betulinic acid (2)	4.3	5.4	12.5
Betulinic aldehyde (3)	1.2	1.3	1.4
Lupeol (4)	7.9	5.9	2.1
Oleanolic acid (5)	2.0	0.3	2.2
Oleanolic acid 3-acetate (6)	—	1.6	3.8
Betulin 3-caffate (7)	0.5	6.2	6.1
Erithrodiol (8)	2.8	—	—
Other (minor)	3.2	6.9	3.8

^a Samples of outer birch bark of *Betula neoalaskana* were kindly transferred for extraction and GC/MS, NMR and HPLC analyses by the Professor of Forest Management, Edmond C. Packee (SNRAS Forest Science Department, University of Alaska, Fairbanks).

Tiré de Krasutsky (2006).

Les résultats du Tableau 1.2 ont été obtenus suite à une analyse par chromatographie gazeuse liée à un spectromètre de masse (GC-MS) permettant ainsi de détecter tous les composés volatiles présents dans les extraits d'écorces. La bétuline présente en grandes quantités dans les extraits d'écorce de bouleau blanc (72,4 %) et l'acide bétulinique (5,4 %) sont deux molécules très intéressantes pour le secteur pharmaceutique en raison de leurs propriétés anticancéreuses et anti-VIH (Krasutsky, 2006; Royer et al., 2016). La bétuline peut s'extraire facilement à l'aide différents solvants peu polaires tels que le chloroforme, le dichlorométhane, l'acétone, l'éthanol, etc. Ce composé est également d'un intérêt en cosmétique. D'ailleurs, l'extrait d'écorce de bouleau est utilisé dans les conditionneurs à cheveux et comme additifs dans la production de shampooing (Patocka, 2003). Des triterpénoïdes pentacycliques, principalement du type lupane et oléane, ont été isolés de l'écorce externe de diverses espèces de bouleau, y compris *Betula papyrifera*. Ces triterpènes ont des activités biologiques très diversifiées telles que bactéricides, antivirales, anti-inflammatoires, cytotoxiques et anticancéreuses (Gauthier et al., 2006; O'Connell et al., 1988; Omar et al., 2000). De nombreuses études se penchent sur l'identification des polyphénols chez le bouleau, toutefois, la majorité a été réalisée sur le bouleau jaune (Keinänen et al., 1999; Lavoie and Stevanovic, 2006). Malgré cela, certains

polyphénols sont communs au genre *Betula* tels que la (+)-catéchine (antioxydant), le salidroside (antiolytique), la (+)-rhododendrine et le platyphylloside (Julkunen-Tiitto et al., 1996; Mshvildadze et al., 2007). Il est toutefois important de noter qu'afin d'obtenir un extrait riche en polyphénols, des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol et l'éthanol doivent être privilégiés (Royer et al., 2012). Finalement, bien que plusieurs études sur le bouleau blanc soient présentes dans la littérature, une seule a montré l'activité antimicrobienne de son écorce (Omar et al., 2000) par la méthode de diffusion sur disque, une technique qualitative. Également, aucune étude n'a fait le lien entre cette activité et sa composition chimique.

1.4 Activité antimicrobienne

Les pathogènes microbiens représentent une cause importante de maladie. Une bataille continuelle est menée dans le but d'irradier ces pathogènes. La découverte d'agents antimicrobiens a ainsi permis de traiter et d'éliminer les infections dont certaines maladies qui étaient auparavant mortelles (Bonafede and Rice, 1997). Un agent antimicrobien est défini par une substance naturelle, synthétique ou semi-synthétique, tel que les antibiotiques et les désinfectants, qui inhibe la croissance de microorganismes ou occasionne leur mort (Santé Canada, 2003). Les agents antibactériens ou antifongiques qui permettent de tuer un pathogène sont appelés bactéricides. Tandis que ceux qui empêchent leur croissance sont appelés bactériostatiques. Ces agents sont utilisés dans divers secteurs tels qu'en médecine humaine et vétérinaire, en agriculture, en aquaculture, dans l'industrie agroalimentaire et sanitaire. Pour chacun de ces secteurs, les normes d'efficacité antimicrobienne ne sont pas les mêmes. Par exemple, lorsqu'il est question d'un agent antimicrobien utilisé comme agent de conservation dans des crèmes cosmétiques, un effet bactériostatique peut être ciblé. Par contre, s'il est question d'un ingrédient actif pour les désinfectants, une activité bactéricide est de mise (Santé Canada, 2014).

1.4.1 Les microorganismes et leurs mécanismes d'action

Il existe différents types de microorganismes tels que les bactéries et les champignons/moisissures. Les bactéries peuvent être divisées en deux classes distinctes soient celles à Gram positif ou à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif sont habituellement plus résistantes aux antibiotiques grâce à la présence de lipopolysaccharides présents à la surface de leur paroi cellulaire (Taylor, 2001).

Les cellules microbiennes se développent et se divisent très rapidement à plusieurs reprises pour atteindre les grands nombres présents pendant une infection ou sur les surfaces du corps. Afin de croître et de se diviser, les microorganismes doivent synthétiser ou absorber plusieurs types de biomolécules. Les agents antimicrobiens interfèrent donc avec des processus spécifiques, essentiels à leur croissance et/ou à leur division. Les agents antimicrobiens peuvent être classés en fonction du composant ou du système cellulaire qu'ils affectent, en plus de préciser s'ils ont un effet bactéricide ou seulement bactériostatique (Kohanski et al., 2010). Les antimicrobiens peuvent agir de plusieurs façons sur les microorganismes afin de les tuer ou les inhiber, ils ont donc différents mécanismes d'action. Plusieurs de ces mécanismes d'action sont bien connus incluant : l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire, l'inhibition de la synthèse de protéines, l'interférence avec la synthèse d'acide nucléique, l'inhibition de voie métabolique intermédiaire et la perturbation de la membrane cytoplasmique (Figure 1.9) (Tenover, 2006).

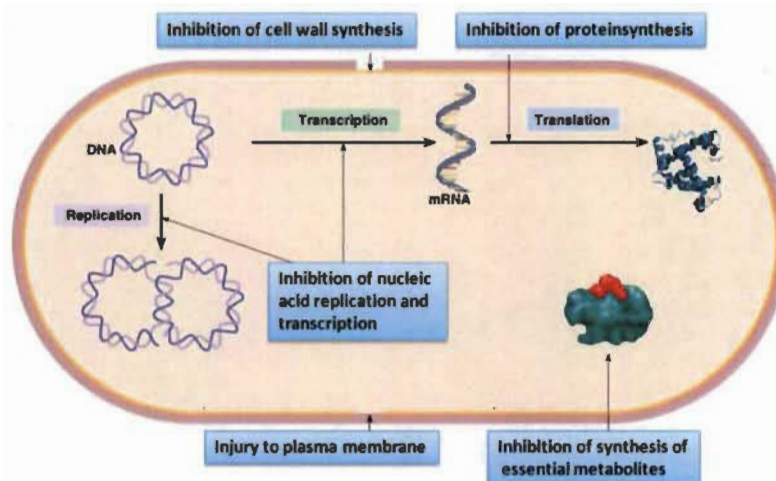


Figure 1.9 Mécanismes d’actions des agents antimicrobiens.
Tiré de Barzic and Ioan (2015).

Sur la base du nombre de médicaments antimicrobiens utilisés cliniquement, la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne est le domaine cible le plus largement exploité pour le développement d’agents antimicrobiens. La paroi cellulaire est une structure essentielle qui est responsable de la forme de la cellule (Liwa and Jaka, 2015). L’une des raisons de sa grande utilisation est due à l’absence de composants de synthèse des parois cellulaires en biologie humaine, ce qui fournit ainsi une sélectivité intrinsèque (Lohner, 2009). Les agents antimicrobiens les plus communément utilisés qui inhibent la biosynthèse des parois cellulaires comprennent les antibiotiques β -lactamines telles que la pénicilline et la céphalosporine (Wilke et al., 2005). Ces antibiotiques inhibent directement la transpeptidase; une enzyme bactérienne responsable de la réticulation du peptidoglycane permettant de former une paroi cellulaire rigide. Cette action augmente ainsi la susceptibilité de lyse et de mort cellulaire du microorganisme (Liwa and Jaka, 2015). Plusieurs classes d’agents antimicrobiens agissent en inhibant la synthèse de protéines (aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, etc.). Puisque la synthèse de protéines microbiennes est dirigée par les ribosomes et des facteurs cytoplasmiques, ce type d’agent vient bloquer différentes étapes de la synthèse des protéines en interférant avec la fonction d’un ou l’autre de ces composants.

Tous ces mécanismes d’action permettent de comprendre la complexité des agents antimicrobiens. Afin d’augmenter l’efficacité et de diminuer les chances que les

microorganismes cibles développent une résistance, l'utilisation d'agents antimicrobiens ayant plus d'un mode d'action est à privilégier (Csermely et al., 2005).

1.4.2 La résistance aux agents antimicrobiens

Depuis plusieurs années, l'utilisation des agents antimicrobiens est en expansion. Leur utilisation inappropriée vient augmenter l'émergence de la résistance aux antimicrobiens (RAM). La RAM survient lorsqu'une substance ou un agent antimicrobien ne permet plus d'inhiber la croissance d'un microorganisme ou de le tuer. Ce pathogène devient alors résistant à cet agent et peut ainsi se multiplier et se propager rapidement (Lorian, 2005). Ce phénomène est en partie dû à la surutilisation des agents antimicrobiens. Par exemple, en 2014, en moyenne 65 % des canadiens se sont fait prescrire une ordonnance d'antimicrobiens contre des infections bactériennes, ce qui représente 23 millions d'ordonnances exécutées (Agence de la santé publique du Canada, 2016). L'augmentation du nombre de souches résistantes menace la capacité à lutter contre les infections humaines et animales, ce qui engendre une grave répercussion sur la santé publique. Les antibiotiques efficaces sont alors de moins en moins nombreux ce qui complique les traitements et augmente les coûts des soins de santé. Plusieurs microorganismes résistants sont bien connus tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) (Conly, 2002).

Suite à l'utilisation des agents antimicrobiens dans différents domaines, la RAM peut se développer pour plusieurs raisons (Santé Canada, 2003). Par exemple, dans l'industrie agro-alimentaire, les antimicrobiens sont utilisés afin de traiter certaines maladies ou pour prévenir des maladies de même que pour stimuler la croissance. Par contre, la transmission de microorganismes résistants peut être très rapide puisque ceux-ci peuvent être transmis par la nourriture, par l'eau ou par un contact direct avec des animaux. Ils peuvent parfois même être transmis par des animaux vers des pathogènes humains. De plus, de faibles doses d'antibiotiques sont ajoutées à l'alimentation du bétail servant à stimuler leur croissance. Cet additif peut ainsi modifier la flore intestinale en éliminant certaines espèces de bactéries, ce qui peut faciliter la prolifération de germes

résistants aux antimicrobiens. En médecine humaine, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre plutôt que la prescription de médicament à spectre étroit vient augmenter le risque de RAM. La meilleure pratique serait d'attendre les résultats d'analyses pour diagnostiquer et cibler un organisme particulier à l'aide du médicament à spectre étroit, le plus efficace qui est disponible sur le marché. L'industrie produit et met en marché des désinfectants pour les mains et les surfaces, ce qui entraîne une utilisation fréquente et inutile de produits contenant des antimicrobiens. De fait, l'utilisation abusive de produits de nettoyage antibactériens dans les ménages, dans la collectivité et dans les établissements de santé, peut mener à un développement accru de la résistance chez les microorganismes communs. Finalement, l'élimination inadéquate d'agents antimicrobiens peut contribuer à la prolifération de bactéries résistantes aux antimicrobiens et à la propagation de la RAM dans l'environnement (Santé Canada, 2003).

Les microbes sont connus pour leur polyvalence vis-à-vis les médicaments. Par contre, ils ont tout de même un nombre limité de mécanismes de RAM acquis (Jacoby and Archer, 1991). Les agents pathogènes microbiens ont développé des moyens génétiques et biochimiques de résistance aux agents antimicrobiens. Ils peuvent avoir une résistance innée ou acquérir cette résistance contre une ou plusieurs classes d'agents antimicrobiens (Liwa and Jaka, 2015). Les principaux mécanismes génétiques conduisant à la résistance aux antimicrobiens sont les mutations génétiques (mutations ponctuelles, délétions ou réarrangements majeurs), l'expression d'un gène de résistance latent et l'acquisition de gènes ou de segments d'acide désoxyribonucléique (ADN) avec des déterminants de résistance. Certains des gènes sont hérités, certains émergent à travers des mutations aléatoires dans l'ADN microbien et certains sont importés via d'autres organismes. Ces changements génétiques codent pour des changements à l'intérieur des protéines de liaison, des ribosomes, la structure membranaire ou pour des enzymes qui dégradent les agents antimicrobiens (Figure 1.10) (Conly, 2002).

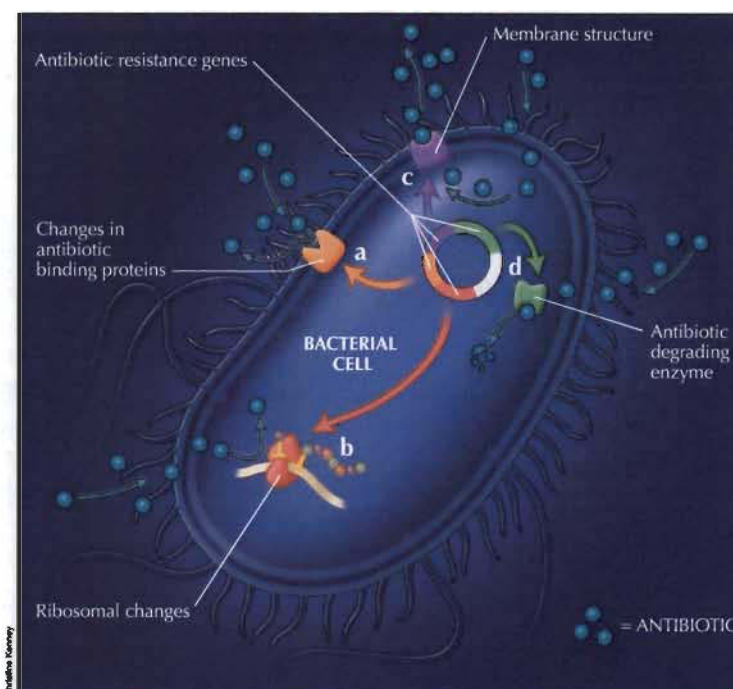


Figure 1.10 Principaux mécanismes génétiques conduisant à la résistance aux antimicrobiens.

Les changements génétiques codent pour des changements dans les protéines de liaison (a), les ribosomes (b), la structure membranaire (c) ou pour des enzymes inactivatrices (d). Tiré de Conly (2002).

Après qu'un agent pathogène ait acquis des gènes de résistance pour se protéger de divers agents antimicrobiens, ceux-ci utilisent plusieurs types de mécanismes de résistances biochimiques (Giedraitienė et al., 2011). Les microorganismes résistent biochimiquement aux agents antimicrobiens en inactivant les médicaments avec des β -lactamases, des acétylases, des adénylases et des phosphorylases ce qui cause différents effets. Ils peuvent ainsi réduire l'accessibilité des sites d'action aux médicaments grâce aux caractéristiques de la membrane, modifier la cible des agents antimicrobiens afin qu'ils ne puissent s'y lier, contourner le métabolisme de l'antimicrobien et développer une tolérance (McManus, 1997).

1.4.3 Les agents antimicrobiens naturels

Puisque le nombre de microorganismes pathogènes résistants est à la hausse, des nouveaux agents antimicrobiens efficaces sont nécessaires pour contenir cette épidémie.

Récemment, plusieurs études ont montré un intérêt particulier pour la composition chimique des plantes pouvant avoir une activité antimicrobienne (Pimchan et al., 2018; Saleem et al., 2010; Vandal et al., 2015). D'autre part, les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par la sécurité des agents de conservation synthétiques utilisés à l'intérieur de plusieurs produits. Par conséquent, il existe une demande croissante de produits naturels pouvant servir d'agents antimicrobiens alternatifs.

Les principaux groupes de composés qui sont responsables de l'activité antimicrobienne des plantes comprennent les composés phénoliques, les acides phénoliques, les quinones, les saponines, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les terpénoïdes et les alcaloïdes (Gyawali and Ibrahim, 2014). Comme il a été question précédemment dans la section sur les métabolites spécialisés, la variation dans la structure et la composition chimique de ces composés entraînent des différences dans leur action antimicrobienne (Savoia, 2012). Par exemple, les composés phénoliques possèdent de grandes variations structurales et constituent l'un des groupes les plus diversifiés de métabolites spécialisés. Il a été démontré que les groupements OH de ces composés provoquent une action inhibitrice de la croissance des microorganismes puisque ces groupes peuvent interagir avec la membrane cellulaire des bactéries pour perturber leur structure membranaire et provoquer l'élimination de composants cellulaires (Lai and Roy, 2004; Xue et al., 2013). De plus, la position du groupement OH peut également influencer l'efficacité antimicrobienne des composés (Dorman and Deans, 2000). Plusieurs autres variations structurales des groupements fonctionnels des composés végétaux peuvent modifier leur activité antimicrobienne. Celles-ci sont énumérées dans la revue de littérature sur les produits naturels utilisés comme agents antimicrobiens par Gyawali and Ibrahim (2014).

Certains antimicrobiens naturels sont de nos jours commercialisés. Par exemple, le thymol, un phénol contenu dans l'huile de thym et dans les huiles essentielles (volatiles) de plusieurs autres plantes, est connu pour ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques (Lambert et al., 2001; Nostro et al., 2007). Cet ingrédient actif est utilisé par diverses compagnies telles que Benefect[®], une entreprise d'Ontario qui utilise l'extrait

d'huile de thymol dans la formulation de produits désinfectants. Également, certaines compagnies québécoises utilisent des extraits végétaux dans la formulation de leurs produits comme les produits ménagers Attitude®.

1.5 Objectif du projet

Le présent mémoire se divise en deux principaux objectifs. Il vise, dans un premier temps, à faire une synthèse de ce qui est connu et moins bien compris actuellement dans la littérature, face aux extractibles forestiers. Ainsi, il est plus facile de cibler ce qui pourrait être réalisé afin de valoriser les résidus forestiers sur notre territoire. La revue de littérature présentée précédemment répond à cet objectif. Elle permet donc de définir la situation de l'industrie forestière, de la place du bouleau blanc et de ses extractibles. Il en ressort plusieurs questions, dont certaines seront abordées dans le second objectif. Dans un deuxième temps, une stratégie permettant de valoriser les résidus forestiers (écorces) du bouleau blanc sur le territoire du Québec a été mise en place. L'objectif principal du projet est de développer une méthode d'extraction de composés ayant des propriétés antimicrobiennes provenant d'écorces du bouleau blanc dans le but de les intégrer à la formulation de produits à hautes valeurs ajoutées. Ainsi, plusieurs méthodes d'extraction ont été réalisées afin de venir extraire les molécules telles que des terpènes et polyphénols. Par la suite, une méthode de micro-dilution en bouillon a permis d'identifier les extraits ayant un potentiel antimicrobien contre différents microorganismes. Ces extraits ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse permettant l'identification de molécules bioactives présentes.

Au final, ce projet permettra à l'industrie forestière de valoriser l'écorce du bouleau blanc grâce à ses extractibles, répondant ainsi aux besoins des industries sanitaires, pharmaceutiques, cosmétiques et nutraceutiques. La Figure 1.11 représente bien le schéma que pourrait prendre l'industrie forestière afin de valoriser ses résidus. L'ajout de la filière extractible pour la création de PHVA avant l'étape de combustion des écorces dans les usines de cogénération sera grandement profitable au Québec.

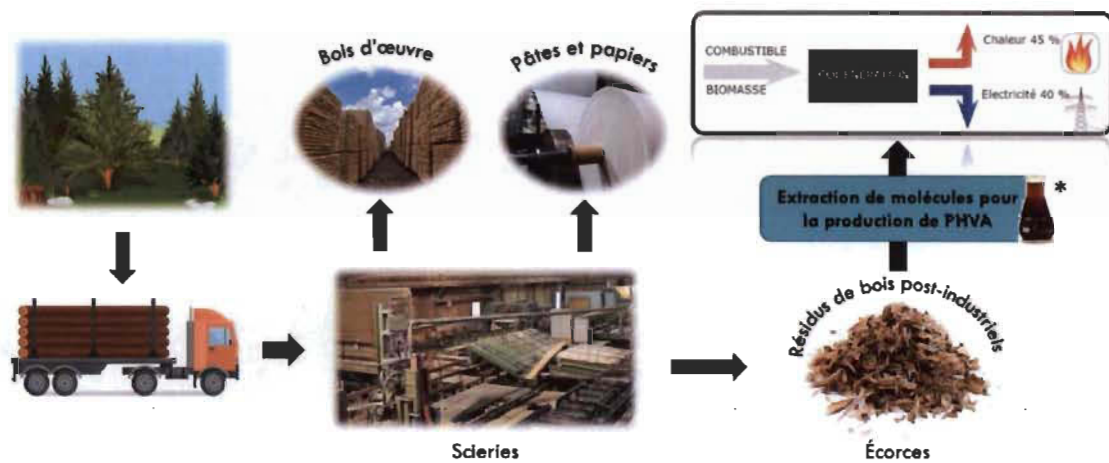


Figure 1.11 Schéma que pourrait devenir l'industrie forestière au Québec.

*Ajout d'une étape de valorisation des résidus forestiers avant leur combustion.

CHAPITRE II

COMPOSITION ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE *IN VITRO* D'EXTRAITS D'ÉCORCE DE *BETULA PAPYRIFERA*

DORIAN BLONDEAU, ANNABELLE ST-PIERRE, ANDRÉ LAJEUNESSE, NATHALIE BOURDEAU, JULIEN BLEY ET ISABEL DESGAGNÉ-PENIX

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour être soumis prochainement dans la revue scientifique *Phytochemistry*.

2.1 Contribution des auteurs

La totalité des figures ainsi que la première ébauche du manuscrit ont été réalisées par Dorian Blondeau. L'ensemble des expériences à la base de cet article a été accompli par Dorian Blondeau avec l'aide d'Annabelle St-Pierre, une étudiante à la maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire dans le laboratoire de la professeure Isabel Desgagné-Penix. Ces recherches et l'ensemble des expériences ont été menés en étroite collaboration avec Nathalie Bourdeau, Julien Bley, André Lajeunesse (co-directeur) et Isabelle Desgagné-Penix (directrice) qui ont participé à l'écriture finale du manuscrit.

2.2 Résumé de l'article

Il a été rapporté que certains extraits de bouleau blanc possèdent des propriétés antimicrobiennes, mais aucune étude n'a associé la composition des extraits d'écorce à leur activité antimicrobienne. Cette étude vise à identifier les extraits d'écorce de bouleau blanc (*Betula papyrifera*) ayant une activité antimicrobienne et à élucider leur composition. Afin d'obtenir un rendement en extractible élevé, les résidus d'écorce ayant une taille > 3 mm ont été sélectionnés pour l'extraction. Un total de dix solvants d'extraction ont été utilisés afin d'obtenir plusieurs extraits composés de différentes molécules. Grâce aux rendements

d'extraction, il est possible d'affirmer que le méthanol et l'éthanol semblent extraire une plus grande quantité de molécules que les autres solvants utilisés. Sur huit microorganismes étudiés, l'extrait aqueux s'est avéré avoir le meilleur potentiel antimicrobien suivi de l'extrait au méthanol. En effet, l'extrait à l'eau inhibe la totalité des microorganismes à une faible concentration, concentration minimale inhibitrice (CMI) entre 0,83 et 1,67 mg/mL. À l'aide de la chromatographie liquide ultra-performante couplée à un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (UPLC-QTOF-MS), plusieurs molécules ayant déjà été étudiées pour leurs propriétés antimicrobiennes dans la littérature ont été identifiées soit dans l'extrait à l'eau ou celui au méthanol. Parmi tous les composés identifiés, le catéchol est l'une des molécules dominantes de l'extrait aqueux d'écorce de bouleau blanc. De plus, son activité antimicrobienne a déjà été étudiée, suggérant que le catéchol pourrait être l'un des composés qui contribue à l'activité antimicrobienne de cet extrait.

2.3 Article scientifique

Composition and *in vitro* antimicrobial activity of bark extracts from *Betula papyrifera*

Dorian Blondeau^a, Annabelle St-Pierre^a, André Lajeunesse^a, Nathalie Bourdeau^c, Julien Bley^c and Isabel Desgagné-Penix^{a,b,*}

^a Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, University of Québec at Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

^b Groupe de Recherche en Biologie Végétale, University of Québec at Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

^c Innofibre, Cégep of Trois-Rivières, Trois-Rivières QC, Canada

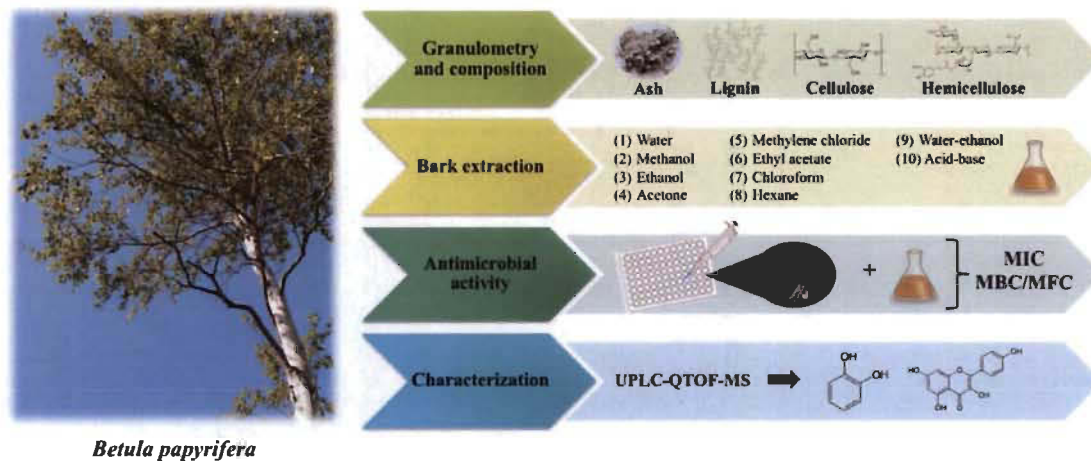
*Correspondence (Tel +819 376 5011; fax +819 376 5084; email Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca)

Abstract

Extracts from white birch have been reported to possess antimicrobial properties, but no study has linked the composition of bark extract with antimicrobial activity. This study aimed to identifying white birch (*Betula papyrifera*) bark extracts with antimicrobial activity and to elucidate its composition. In order to obtain the highest extraction yield, bark residues > 3 mm were selected for extraction. A total of ten extraction solvents were used to determine the extraction yield of each of them. Methanol and ethanol solvents seem to extract a greater proportion of molecules. Of eight microorganisms tested, the water extract proved to exhibit the best antimicrobial potential followed by the methanol extract. Water extract inhibits all microorganisms with low concentration, minimal

inhibitory concentration (MIC) between 0.83 and 1.67 mg/mL. Using ultra-performance liquid chromatography coupled to a time-of-flight quadrupole mass spectrometer (UPLC-QTOF-MS), several molecules that have already been studied for their antimicrobial properties have been identified in water and methanol extracts. Catechol was identified as one of the dominant component in white birch bark water extract, and its antimicrobial activity has already been studied, suggesting that catechol could be one of the component contributing to the antimicrobial activity of this extract.

Graphical abstract



Highlights

- Potential of bark extracts obtained from white birch as natural antimicrobial agent.
- Water extract proved to have the best antimicrobial potential followed by methanol extract.
- Characterization by UPLC-QTOF-MS identified several molecules that may contribute to the antimicrobial activity.

- Catechol was identified as one of the main component in water extract with antimicrobial properties.

Keywords

Betula papyrifera; bark extracts; antimicrobial activity; TLC; UPLC-QTOF-MS

Introduction

More than 50 million tons of bark, mainly derived from pulp and wood industries, are produced annually in North America (Gupta, 2009). In Canada, only a fraction of the bark is used as an energy source by direct combustion, and the rest of the bark is incinerated or landfilled as waste (Cheng et al., 2006). Both incineration and landfilling are non-sustainable avenues whereas the combustion of bark is not ideal for energy production as it contains a high ash content that lower its heating values. Thus, the combustion of bark for energy recovery is not economically advantageous. In addition to ash, cellulose, hemicellulose and lignin, bark also contain small amount of bioactive compounds called extractives, which have to potential to provide value-added co-products from bark. Recent studies have revealed that forestry wastes such as bark potentially possess important properties for new applications which related to its chemical content (Feng et al., 2013; Jablonsky et al., 2017).

The biodiversity of the boreal forest constitutes an important pool of natural bioactive compounds (Royer et al., 2016; Royer et al., 2012). For example, the white birch (*Betula papyrifera*), one of the broadleaved species widely present in the boreal forest of North America, contains a large amount of bioactive molecules including terpenoid and phenolic compounds known to have antimicrobial and antioxidant properties (Mshvildadze et al., 2007; Royer et al., 2012). The extraction of such compounds for the valorization of bark content prior to thermal energy production is an interesting way to make it economically and environmentally advantageous for several industries (e.g. pharmaceutical, cosmetic, food and sanitary industries). This important and inexpensive

source of bioactive molecules could be used in the formulation of bio-sourced products thus promoting applications for forest industries. As a result of the industrial method of wood processing, bark residues are removed from the sapwood and discarded (Celhay et al., 2014). This is why these residues are present in large quantities, thus representing an abundant and currently underutilized natural resource (Zhao et al., 2007). Currently in Québec, the only valorization of bark is its unefficient transformation into heat and electricity by cogeneration central. It is therefore necessary to find new ways to valorize of this biomass including the production of bio-sourced products.

The use and research for new drugs, food supplements and sanitary products derived from plants has continuously increased in recent years. In particular, natural products represent new avenues for the treatment of infectious diseases (Saleem et al., 2010). While 25-50% of current pharmaceuticals come from plants, few are used as antimicrobial agents (Gurib-Fakim, 2006). Plants are known to be rich in a wide variety of specialized (aka secondary) metabolites (*e.g.* phenolics, terpenoids, and alkaloids), often studied *in vitro* for their antimicrobial properties (Cowan, 1999; Royer et al., 2013). These specialized metabolites are produced in various plant tissues whose main function is to protect the plant against fungi, bacteria and insects attacks (Omar et al., 2000; Wink, 1988). For example, the antimicrobial activity of plant phenolic compounds such as catechin and ellagitannins has been intensively studied (Chandra et al., 2017; Daglia, 2012; Puupponen-Pimiä et al., 2005; Zhang et al., 2016). In addition to controlling invasion and growth of plant pathogens, thymol and carvacrol, two terpenoids, were found to be active against human pathogens as well (Barbieri et al., 2017; Moon and Rhee, 2016). The use of plant specialized metabolites as antimicrobial compounds tends to increase due to the constant emergence of microorganisms resistant to current antimicrobial agents (Amábile-Cuevas, 2003; Saleem et al., 2010). However, the majority of these studies focus on flowering plants and not on woody plants or forest biomass. It is therefore essential to investigate the antimicrobial potential of specialized metabolites present in bark residues of Québec's forest industries to valorize these residues and to expands the repertoire of antimicrobial compounds.

White birch is an important source of extractives with many interesting biological properties for the formulation of high value-added co-product (Krasutsky, 2006). Birch bark is a low-value waste product in the forest industry (Ekman, 1983). In fact, 96 000 tons of paper birch bark is produced annually in Québec province (Pedieu et al., 2009). The majority of extractives from this species is obtained from its bark with a yield of 22 g/100 g of dry bark (Krasutsky, 2006). Previous studies on white birch showed that specialized metabolites (e.g. terpenoids and polyphenols) from this tree possess several beneficial pharmacological properties (Gauthier et al., 2006; Krasutsky, 2006; Vandal et al., 2015). For example, pentacyclic triterpenoids, mainly of the lupane and oleanane types, have been isolated from the outer bark of various species of birch, including *Betula papyrifera*. These triterpenoids displayed diversified biological activities such as bactericidal, antiviral, anti-inflammatory, cytotoxic and anticancer (Gauthier et al., 2006; O'Connell et al., 1988; Omar et al., 2000). Specifically, betulin found in large quantities in the bark of white birch (72.4%) and betulinic acid (5.4%) are two lupane triterpenoids with great interest for the pharmaceutical sector because of their antimicrobial, anticancer and anti-HIV properties (Krasutsky, 2006; Royer et al., 2016). In addition, birch phenolic compound platyphylloside was shown to exert anticancer activity *in vitro* against lung carcinoma (A-549) and colorectal adenocarcinoma (DLD-1) human cell lines (Mshvildadze et al., 2007). Although the antimicrobial potential of a few specialized metabolites from white birch has been reported, the composition of bark extractives and its correlation with antimicrobial activity has not yet been investigated.

The objective of this research was to extract the specialized metabolites present in the bark of white birch and to determine the optimal conditions to maximize extraction yields either by using different solvents or different bark granulometries. Initial screen of specialized metabolites obtained was performed using thin-layer chromatography and different colorimetric revelation methods. In addition, the antimicrobial activity of the extracts was measured on eight different microorganisms using a broth micro-dilution method. The minimal inhibitory concentration (MIC) as well as the minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) were evaluated. Finally, the chemical composition of birch extracts with antimicrobial potential was determined using ultra-

performance liquid chromatography coupled to a time-of-flight quadrupole mass spectrometer (UPLC-QTOF-MS). The characterization of the compounds present in each extract allows to identify molecules with an associated antimicrobial activity. This research demonstrates that white birch bark extracts have a potential to be use as novel antimicrobial agents.

Experimental

Material and reagent

A total of ten solvents were used for the extraction of bark. The majority were purchased from Fisher Scientific (methanol HPLC Grade, ethanol denatured, acetone certified ACS, hexane HPLC Grade), while the others (chloroform 99.9%, methylene chloride >99%, ethyl acetate 99.6%) were obtained from Acros Organics. For the acid-base extraction, hydrochloric acid (Fisher certified ACS) was used to acidify methanol at pH 4, as well as 7 N ammonia (Acros organics) to alkalize the aqueous fraction during liquid-liquid extraction. For the revelation of thin-layer chromatography (TLC) plates, reagents were purchased from Fisher Chemical. All extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), certified ACS from Fisher Chemical.

Plant material and granulometric fraction

White birch (*Betula papyrifera*) bark was collected from the Thomas-Louis Tremblay industry, a sawmill from Ste-Monique in Lac-St-Jean (Québec, Canada), during the winter of 2016. The collected bark residues were immediately dried at room temperature. Before starting the laboratory tests, we determined the best size of bark particles to achieve an optimal extraction yield. To do this, bark residues were sieved with different sizes of strands to obtain five fractions of different bark particle sizes. These fractions were extracted with either of the three solvents: water, water-ethanol and ethanol.

Bark composition

The ash, extractives, lignin, cellulose and hemicellulose composition was determined using the National Renewable Energy Laboratory (NREL) protocols: TP-510-42618, TP-510-42619, TP-510-42620, TP-510-42622 (Hames et al., 2008; Sluiter et al., 2005a; Sluiter et al., 2008b; Sluiter et al., 2005b). Briefly, the method for determining the ash composition was based on the percentage of residue remaining after dry oxidation at 550 to 600 °C. All results are reported relative to the 105 °C oven dry weight of the sample. The extractive composition was carried out using a Soxhlet apparatus with ethanol at reflux for 16-24 h. The lignin content was measured by UV-Vis spectroscopy (Hach DR6000) after a two-step acid hydrolysis to fractionate the biomass into forms that are more easily quantified. The monomeric sugars constituting cellulose and hemicelluloses were quantified by ion chromatography (Dionex ICS-5000) with the Dionex CarboPac SA-10 column and the electrochemical detector.

Bark extraction

The bark was grounded into a fine powder (0.425 mm) by using a Wiley mill. Ten different solvents were used with three solvent-dependent extraction techniques: water (1), methanol (2), ethanol (3), acetone (4), methylene chloride (5), ethyl acetate (6), chloroform (7), hexane (8), water-ethanol (9), and acid-base (10). The last solvent corresponds to a liquid-liquid extraction technique using several solvents described by Yubin et al. (2014). This method allows mainly the extraction of alkaloids from the bark. The majority of the extracts (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) were obtained using the soxhlet extraction technique during 7 h of reflux. The other two extracts (1, 9) were obtained using an accelerated solvent extractor (Dionex™ ASETM 350, ThermoFisher). The solid bark was extracted with distilled water at 100 °C and 1500 psi over 6 cycles of 10 min each. For the water-ethanol extract (9), a liquid extraction with ethanol was carried out following a first extraction with water. The liquid extract was re-extracted with ethanol at 120 °C and 1500 psi over 6 cycles of 5 min. Finally, all extracts were evaporated to dryness in a low temperature oven.

Thin layer chromatography method

The ten extracts were dissolved in their respective solvent to a final concentration of 10 mg/mL and these solutions were used for preparative thin layer chromatography. For that purpose, TLC (Aluminium TLC Silica gel 60 F₂₅₄) plates of size 14 × 20 cm were used. Drops (7 µL) of each extracts solution were loaded individually onto the baseline of the layer, which was then developed with chloroform: methanol (9:1 v/v). A solution containing several standards concentrated at 1000 ppm (piperine, vanillin, ferulic acid, glucose and betulin) was prepared. On each TLC, 7 µL of this solution was deposited in order to visualize the separation of different families of compounds. The layer was dried, observed in a UV chamber at 254 nm and has been revealed with several chemical revelators. The revelators used were a p-anisaldehyde sulfuric acid solution to visualize all types of compounds present in the extract (Jork et al., 1990), iron chloride reagent (FeCl₃) to observe the presence of phenols (Jork et al., 1990) and Dragendorff reagent for alkaloids compounds (Sasidharan et al., 2011).

Microorganisms cultures

The white birch extracts were individually tested against a panel of microorganisms including Gram negative strains *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enterica* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1542, Gram positive strains *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, fungal strains *Aspergillus niger* ATCC 10535 and yeast strains *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. The two yeast strains were supplied by the microbiology laboratory of the Université du Québec in Trois-Rivières (Québec, Canada). Bacterial strains were cultured overnight at 37 °C in Mueller Hinton agar (MHA) prior to the antimicrobial tests. Fungus and yeast (fungi) strains were cultured for 72 h at 37 °C in Sabouraud dextrose agar (SDA).

Antimicrobial assays

The antimicrobial activity of the extracts was studied using the broth microdilution method, with appropriate cultures media. For example, Mueller Hinton broth (MHB) was used for bacteria and Sabouraud dextrose broth (SDB) for fungi. Microorganism suspension were prepared into sterile 0.9% saline solution to obtain a final inoculum estimated at 1.5×10^8 cfu/mL for bacteria, 1.5×10^6 cfu/mL for yeast and 1.5×10^4 cfu/mL for fungus, according to 0.5 McFarland turbidity value as measured using turbidimeter (Hach, 2100AN). Extracts were prepared and dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/mL. According to the antimicrobial test method, the highest DMSO concentration found in the microplate well was 26%, which had no influence on microbial growth of the tested microorganisms (data not shown).

To test the antimicrobial properties of the extracts, 96-well plates were prepared according to a modified method of (Balouiri et al., 2016). Initially, a screening of the extracts using 4.5% was carried out in order to quickly identify the potential extracts that allow inhibition of the microorganism growth. These extracts were further tested using microdilution. The microdilution method was initiated by dispensing 100 μ L of each extract in the first column of a 96-well plate containing 50 μ L of broth (MHB or SDB). Serial dilutions of the extracts were carried out in order to obtain a final concentration between 4.44 to 0.01 mg/mL. An equal volume (50 μ L) of microbial suspension was added into the wells. Negative and positive controls were prepared without antimicrobial agent and with quaternary ammonium solution (BTC 2125M-80%) obtain from Sani Marc Group, respectively. The plates were incubated at 37 °C during 3 h for bacteria and 6 h for fungi. Then, to indicate the metabolic activity of the microorganisms, 40 μ L/well of INT (2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride, Sigma) dissolved in water (2.85 mg/mL) was added to each well. This tetrazolium salt is reduced to red formazan dye by the active dehydrogenases of living cells. The visual development of colour was observed after incubation under appropriate cultivation conditions during 1 h for bacteria and 16 h for fungi. MIC values were defined as the lowest concentration of each natural product which no color appeared, meaning that microbial growth was inhibited. Results were expressed in milligrams per milliliters. All measurements of MIC

values were repeated in duplicate. To determine minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC), an aliquot (100 μ L) of each incubated well, with concentration equal or over the MIC, was plated onto MHA for bacteria and SDA for fungi. MBC and MFC were defined as the lowest concentration that allows no visible growth on agar after 24 h of incubation for bacteria and 48 h for fungi.

UPLC-QTOF-MS analysis

These analyses were carried out externally by the Centre de Recherche Industrielle du Québec (CRIQ). Briefly, a UPLC analysis was performed using a Waters Acquity Ultra-Performance LC system (Waters), equipped with a binary pump system (Waters, Brossard, Canada). An Acquity Ethylene Bridged Hybrid (BEH) C18 column (100 mm_2. mm id, 1.7 mm particle size) from Waters was used. The molecules were separated with a mobile phase that consisted of 0.2% Acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The flow-rate was 0.2 mL/min and the gradient elution was initial, 2% B; 0-1 min, 2–100% B; 1-30 min, isocratic 100% B; 30-33 min, 100-2% B; 33-33.5 min, isocratic 2% B; 33-40 min. The mass spectrometry (MS) analyses were carried out on a QTOF Micro mass spectrometer (Waters, Brossard, Canada) equipped with a Z-spray electrospray interface. Each analysis was performed in both, positive and negative mode, and the data were acquired through a masses scan from 100 to 1250 m/z. The ionization occurred at 120 °C using a cone gas flow rate of 50 L/h and desolvation gas flow rate of 350 L/h, and a desolvation temperature set at 200 °C. Nitrogen (99% purity) was used as nebulizing gases. Data interpretation was carried out with the MassLynx 4.1 software. Masses extraction, deconvolution, isotopes and library search was performed using MZMine 2 (Pluskal et al., 2010).

Statistical analysis

Extraction experiments were carried out in triplicate. Data were expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences ($p < 0.05$) among the mean values of extraction results were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed

by Tukey test, using the Past 3 statistical software (version 3.16; Hammer, Harper, D.A.T, Ryan, P.D. 2001).

Results

Granulometry, composition and extraction yields

The residues of white birch bark were sieved using different sieve sizes to obtain five fractions of different bark particle sizes. The different fractions were crushed and extracted using three solvents: water, water-ethanol and ethanol. The extraction yields (g/100 g of bark) obtained for each granulometric fraction of bark are summarized in **Figure 1A**. A trend, specific to the extraction solvents used, can be observed where in general, extraction with ethanol allows a greater extractable yield compared to other solvents (**Fig. 1A**). With regard to the extraction yield in function of the particle size distribution, it is observed that the smaller fractions (3-7 mm and < 3 mm) extract a smaller amount of compounds than the larger ones (7-45 mm and > 45 mm). For example, after an extraction with ethanol, the fraction 7-45 mm and > 45 mm allow to extract respectively 8.82 and 5.76 g of compounds/100 g of bark, whereas the fractions < 3 mm and 3-7 mm extracted close to 8X less with only 1.12 and 0.88 g/100 g of bark, respectively.

Next, we quantified the ash content present in all particle size fraction of bark residues, the values obtained for two of these fractions are presented in **Figure 1B**. The ash content of the fraction < 3 mm was significantly higher compared to fraction 3-7 mm. Thus, higher ash content was present in the fraction containing smaller particles < 3 mm (3.94%) compare to fraction 3-7 mm (2.21%). Thus, the fraction > 3 mm eliminated most of the ashes and gave the highest yields of extractive from residual weight of initial amount of bark (g) (13.3% ethanol, 8.75% water-ethanol and 7.94% water).

The general composition of white birch bark residues was assessed and summarized in **Figure 1C**. The values were reported as a percentage of the total mass of the whole

fraction > 3 mm. The largest proportion of the composition corresponded to lignins (36.55%), followed by cellulose (21.70%) and hemicellulose (14.70%). In addition, the average extractive content following ethanol extraction was 13.05% (**Fig. 1C**).

The extraction yields of the residues as a function of the solvent used are illustrated in **Figure 1D**. The results show that alcohol solvents were more effective and extracted more compounds altogether with the methanol and ethanol extracts having a respective percent extraction of 16.10% and 14.56% (**Fig. 1D**). These two polar solvents extracted more compounds present in residues, whereas the less polar solvents (*e.g.* hexane 5.64% yield) had lower extraction yields. In addition, the acid-base extraction protocol aimed to extract alkaloid compounds displayed the lowest extraction efficiency with 3.09% and appeared to be the least optimal condition to obtain the highest weight of dry extractive (**Fig. 1D**).

Metabolite profile – Thin layer chromatography

Next, we assessed the general chemical composition of crude white birch bark extracts using thin layer chromatography (TLC) (**Figure 2**). The TLC plates correspond to the chromatogram showing the separation of compounds present in each extract using different revelation reagents. Based on the mobile phase used, most of the polar compounds present in the extracts were found at the bottom of the TLC plate while less polar compounds migrated to the top of the silica TLC plate. With the help of standards, this technique made it possible to roughly visualize which types of molecules were present in each extract according to their polarity. Each TLC plate showed a lane of each extract (1-10) and a lane containing four standards (S) (P: piperine, V: vanillin, B: betulin, F: ferulic acid, G: glucose) (**Fig. 2**). The first TLC plate showed compounds that reacted with UV ($\lambda = 254$ nm), in other words, aromatic compounds having a strong conjugation in their molecular structure (**Fig. 2A**). On this plate, only three standards were visualized piperine (P), vanillin (V) and ferulic acid (F) pertaining to their chemical structure. On the second TLC plate, separated compounds reacted with the *p*-anisaldehyde reagent to demonstrate the presence of different families of compounds (**Fig. 2B**). Each of these

families reacted differently and can be distinguished by their different colors. The colored compounds at the bottom of the plate are strongly polar. For example, sugars such as glucose (G) showing a green spot in the standard column (S). While the compounds higher on the plate are less polar, such as betulin (B), a triterpenoid characterized by a purple spot. Results showed that extracts using polar solvents such as water, methanol and ethanol contained a greater proportion of sugars (green-brown spots) than the other extracts. Moreover, all extracts appeared to have several nonpolar compounds including terpenoids (purple spot) and phenolic compounds. The third TLC plate showed the phenolic compounds which reacted with iron chloride (FeCl_3 ; **Fig. 2C**). Phenolic compounds in the extracts had more affinity for the mobile phase and were concentrated at the top of the TLC plate. By comparing the last two TLC plates with each other, it is interesting to note that the two lines of purple spots at the top of the second plate likely corresponded to phenolic compounds since they are found at the same position (R_f of 0.8 and 0.9; **Fig. 2B**) than the spots at the top of the third plate that reacted with FeCl_3 (**Fig. 2C**). In addition, the Dragendorff reagent, used to visualize the presence of alkaloids, was applied to a TLC plate. However, the results showed a very low presence (accumulation and number) of these compounds in the white birch extracts (data not shown).

Antimicrobial activity

Using a broth microdilution method, the antimicrobial activity of the ten extracts was determined on eight microorganisms. **Table 1** shows the results obtained regard to the antimicrobial power of bark extracts on five bacteria and three fungi according to the extraction solvent used. A quaternary ammonium compound (QAC, BTC 2125M-80%, Stepan[®]) was used as a positive control because it is a well-known powerful antimicrobial agent often used as an active ingredient in the formulation of several biocidal products such as surface disinfectants. In addition, for each test, a negative control without agent or extract added was carried out and resulted in growth of each microorganism (data not shown).

All extracts of white birch bark residues inhibited the growth of *Salmonella enterica*, a Gram-negative bacterium (**Table 1**). For this bacteria, the MIC of each extract was 1.67 mg/mL, except for the water and acetone extracts which had a respective MIC value of 0.83 and 4.44 mg/mL. In addition, only the extracts with methanol, methylene chloride and chloroform displayed bactericidal effect on *S. enterica* at a concentration of 4.44 mg/mL. For *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, only the water and methanol extracts promoted inhibition, and none caused total kill. The acid-base extract inhibited the growth of five out of eight microorganisms tested and was fungicidal for *C. albicans* with a MFC value of 4.44 mg/mL (**Table 1**).

Looking at the full range of antimicrobial test results, few extracts stood out and displayed greater potential as an antimicrobial agent. For example, the water extract inhibited all eight microorganisms tested and showed bactericidal effect on bacteria *Staphylococcus aureus* (MBC 1.67 mg/mL) as well as on yeast *Saccharomyces cerevisiae* (MFC 4.44 mg/mL). It was therefore the most promising extract because of its broad spectrum of antimicrobial activity at low concentrations, since its MIC were found between 0.83 and 1.67 mg/mL. The methanol extract was another promising one, because it inhibited the growth of five microorganisms (*S. enterica*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *A. niger* and *S. cerevisiae*) at MIC of 1.67 mg/mL except for *S. aureus* and *S. cerevisiae* that have a respective MIC of 4.44 and 2.22 mg/mL. In addition, this extract displayed bactericidal effect on *S. enterica*, *S. aureus* and *E. faecalis* at a concentration of 4.44 mg/mL. The extract obtained using the acid-base extraction method, which is specific to enrich alkaloids, also shows a strong antimicrobial activity. It inhibits the growth of five microorganisms (*E. coli*, *S. enterica*, *A. niger*, *C. albicans* and *S. cerevisiae*) and kills only one of the microorganisms, *S. cerevisiae*, at a concentration of 4.44 mg/mL.

Characterization UPLC-QTOF-MS

After selection of the extracts with the best antimicrobial activities, it was important to identify their exact chemical composition to help target molecules that may be responsible for the biological activity.

The chemical composition of the white birch bark water and methanol extracts analyzed by UPLC-QTOF-MS is presented respectively in **Table 2** and **Table 3**. These tables show the different molecules identified using database based on their exact mass. The compounds in the tables were selected on the basis of their relevance and percentage of area under the peak ($\% \text{ area} \geq 0.50$). The identified compounds were classified into families of molecules. Using this method of analysis, it was possible to notice that the retention time was not similar or even close together between the same family of compounds. This value derives from the affinity of each constituent for the stationary phase, which depends on its solubility in this phase and its polarity. Two modes of ionization were used, namely the positive mode (M+H) and the negative mode (M-H) to ensure that the majority of compounds were detected and identified during the analysis.

The water and methanol extracts contained a large number of phenolic compounds and acids. With regard to the water extract (**Table 2**), the presence of 9 phenolics and 11 acids was noted, including epirosmanol which is present in large proportion (5.88%) and catechol (6.47%). The methanol extract (**Table 3**) contained a total of 10 phenolic compounds and 7 acids. In addition, among the non-volatile components identified, pinidine (6.57%) was found to be most dominant compound in the methanol extract of white birch bark. Some acids were present in both extracts including caffeic acid, hydrobenzoic acid, and coumaric acid. However, these three acids were present in higher proportion in the extract with water. Finally, as anticipated it is observed that the water extract contained more sugars and glycosylated molecules compared to the methanol extract (**Table 2** and **3**).

Despite several articles reported the high betulin content of white birch and its bark (Krasutsky, 2006; O'Connell et al., 1988), no betulin or nor betulinic acid was detected in water and methanol extracts. However, betulin was detected in samples extracted with less polar solvent including the acid-base, ethyl acetate and hexane extracts (data not shown).

The chemical characterization of white birch bark extracts made it possible to target molecules with reported antimicrobial properties (**Table 4**). A total of six phenolics, one alkaloid and five acids were listed in either the water or methanol extract. However, most of these molecules were found more abundant in the water extract. Catechol, also known as pyrocatechol or 1,2-dihydroxybenzene, is a phenolic organic compound present at 6.47% in water bark extract. This molecule is a monomer of flavan-3-ol, one of the components of proanthocyanidin polymers (condensed tannins).

Discussion

Granulometry, composition and extraction yields

The first step of the study was to analyze the crude bark residues of white birch. Since these are post-industrial residues, the bark samples received were not perfectly homogeneous and the chips were of different sizes. Pieces of wood could be found in the residues considering the bark has been removed from the sapwood directly in sawmill following industrial mechanical processes. It was therefore essential to determine which fraction of bark allowed a better yield of extraction after sieving. The use of bark particle size fractioning is generally used in the treatment of biomass and may be used for selective enrichment of specific components (Miranda et al., 2012, 2013; Silva et al., 2011). The fraction > 3 mm of the residues was used for the rest of our study due to its greater extractive content and lower ash content (**Fig. 1A, B**). Ashes are inorganic, undesirable material during extraction, and tend to accumulate in smaller fractions during biomass processing due to its fine size and fragility (Bridgeman et al., 2007; Liu and Bi, 2011). In addition, the smaller particles decrease the yield on the total weight and may correspond to particle (*e.g.* sand) that can damage the process equipment. On the other hand, it has been shown that the extent of mineral accumulation in bark fractions depends on the species (Miranda et al., 2012). The ash content of *Betula papyrifera* was reported as 1.8% of the bark biomass by (Corder, 1976). This value is similar to that obtained in our study (2.10%).

Although the composition of white birch extracts has been studied before, the composition of raw bark has been much less studied. Harkin and Rowe (1971) reported that the total extractive content is 22.4% and lignin 37.8% (Krasutsky, 2006). Our results are consistent with these studies since the extractive composition obtained is 13.05% and the lignin content is 36.55% (**Fig. 1C**). The composition of the bark has not been fully characterized, a certain proportion (11.89%) corresponds to other components. These compounds may be some degradation products present in the bark such as hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural, as well as other components of interest, such as organic acids and sugar alcohols (Sluiter et al., 2008a).

Methanol and ethanol solvents significantly extracted a greater percentage of molecules (**Fig. 1D**). These two solvents allow the extraction of polar compounds, which include polyphenols, sugars and some organic acids corresponding to a significant proportion of the total content of the extracts (**Table 2 and 3**) (Royer et al., 2012). Less polar solvents such as chloroform and hexane extracted waxes and non-polar compounds such as triterpenoids present at 20-35% in white birch bark (Krasutsky, 2006). The extraction with hexane (5.64%) and the acid-base extraction (3.09%) are the least optimal methods for obtaining the highest dry weight in extractive. On the other hand, despite the fact that the methanol and ethanol extracts have higher extraction yields, the eight other solvents should not be eliminated since there are no significant differences between these two and those with acetone, ethyl acetate, chloroform and water-ethanol. The choice of the best solvent should be determined by the molecules it can extract, those that will provide an antimicrobial effect and its potential uses in industry. It is certain that a very low extraction yield would be unfavorable since it would require a huge amount of bark residues to achieve an effective concentration of extract to act as antimicrobial agent. However, if the quantity of extract that can inhibit the growth of microorganisms is low, it is possible that this extraction will be still profitable.

Antimicrobial activity

Plants contain bioactive molecules in their different tissues and one of the function of these specialized metabolites is to protect plants against microbial invaders (Vardar-Ünlü et al., 2008). A study about the antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees demonstrate that bark extracts had higher inhibitory effect to both bacteria and fungi strains tested than wood extracts (Omar et al., 2000). The bark is the outer most protective part of the tree, so it has a greater amount of specialized metabolites with antimicrobial properties since bark is the first barrier to defend the tree against biotic and abiotic stress.

Among the ten bark extracts studied, the water extract had the most extensive antimicrobial activity on the eight microbial strains tested followed by methanol extract (**Table 1**). The water extract had a bactericidal effect on two microorganisms in addition to inhibiting the growth of all tested strains. This is linked to the greater capacity of the water to concentrate the pool of active molecules in this extract. In fact, specialized metabolites with an antimicrobial activity appeared to have more affinity for polar solvents such as water and methanol than non-polar solvents. Furthermore, as water is a low-cost “green” solvent (better for environment), it would therefore be a solvent of choice for extraction in the industry (Capello et al., 2007). As well, the acid-base extract specific to alkaloids, also demonstrated a strong antimicrobial activity. However, this extraction protocol uses solvents harmful to the environment including hexane and chloroform, which is why this extract is considered less interesting in an industrial context of green chemistry compared to the extract using water or methanol.

Aforementioned, not much is known about the antimicrobial properties of white birch extracts, and even less from the bark (Vandal et al., 2015). However, it should be noted that Omar et al. (2000) have shown that ethanol extracts of white birch bark exhibited antimicrobial properties against four bacterial species (two Gram-positive and two Gram-negative), but no antifungal activity were observed. In our study, we show that the ethanol extract inhibits microbial proliferation of *S. enterica* and *P. aeruginosa*, but no effect was observed on *E. coli* and *C. albicans*. In contrast, several studies highlighted

this biological activity in extracts of yellow birch (*Betula alleghaniensis*) also present in North America. For example, the aqueous bark extract of yellow birch showed antifungal activity against *S. cerevisiae* (MIC 0.1 mg/mL) as well as antibacterial activity against *E. coli* (Royer et al., 2013; Webster et al., 2008). Furthermore, various studies reported on the antimicrobial activity of different parts of white birch, other than bark. For example, Vandal et al. (2015) demonstrated the antimicrobial activity of ethanol extracts of white birch foliage, twigs, branches and phloem against *S. aureus* and *C. albicans*. It was further shown that methanol extract of air-dried white birch branches had activity against six of eleven tested bacteria (four Gram-positive, two Gram-negative) and three fungal species (Borchardt et al., 2008; McCutcheon et al., 1992, 1994).

In most studies, the antimicrobial activity of white birch is related to the high abundance of triterpenoids such as betulin and lupeol extract with a less polar solvent such as hexane (Krasutsky, 2006; Krasutsky et al., 2007). However, the presence of phenolic compounds in water and methanol extracts (more polar solvents) could also be attributed to greater antimicrobial activity as demonstrated by our results also supported by Royer et al. (2012). In agreement with our results, studies on other North America trees such as *Populus* species have shown that flavonoid and esters of phenolic acids are generally regarded to be responsible for the antimicrobial activity (Vardar-Ünlü et al., 2008). Kedzia et al. (1990) reported that the mechanism of antimicrobial activity is complex and could be attributed to synergism between flavonoids, hydroxyacids and sesquiterpenes.

Characterization of extracts

The water and methanol extracts contained a large proportion of phenolic compounds as well as many organic acids such as hydrobenzoic acid and coumaric acid present in both extracts (**Table 2** and **3**). Catechol, a phenolic compound synthesized by the shikimate pathway in plants, was widely present in the water extract (Kocaçalışkan et al., 2006). Catechol has been isolated by Kuiters and Sarink (1986) from leaf and needle litter of several deciduous (beech, birch, oak, hazelnut, maple, willow and poplar) and coniferous trees (spruce-fir, douglas-fir and larch), and there is also an indication that it is

synthesized abundantly in onions and released by their outer layer cells (Farkas and Kiraaly, 1962). Furthermore, catechol has been shown to have antifungal effects on *Colletotrichum circinans* fungus (Farkas and Kiraaly, 1962) and significantly inhibited the growth of *Clostridium difficile* and moderately inhibited the growth of *E. coli* (Jeong et al., 2009). The results of several previous studies indicated that catechol and its derivatives act as antioxidants in eukaryotic cells, thereby preventing degenerative diseases such as cancer and heart disease (Berberian et al., 2007). Thus, the present results suggested that catechol could be a major active component in white birch bark extract contributing to its antimicrobial activity.

More sugars were present in the water extract than methanol, and this is consistent with the findings of Sjöström and Alén (2013), which suggested that carbohydrates have more affinity for water than other solvents because of its strong polarity. In an antimicrobial agent context, it is preferable to use an extract with less proportion of sugars. Indeed, it has been shown that sugars increase microbial growth because it serves as food for bacteria and fungi. On the other hand, when looking at the results obtained from the antimicrobial assays with each extract, we found that the water extract had a strong antimicrobial activity on the majority of the microorganisms tested. So, despite the presence of sugars, the specialized metabolites present in the extract must have a sufficiently high antimicrobial power to allow the inhibition and the death of microbial strains.

The following four polyphenols were found across the genus *Betula*: (+)-catechin, salidroside, (+)-rhododendrin and platyphylloside (Royer et al., 2012). The (+)-catechin 3-O-gallate molecule was identified in our water extract. Several studies have shown that (+)-catechin, a flavonoid produced by the plant was found to have strong antimicrobial properties (Bais et al., 2002). (+)-Catechin is also a well-known antioxidant free radical scavenger, antifungal and antitumor, and insect repellent properties have been attributed to it (Fukuhara et al., 2002; Veluri et al., 2004). Several glycosylated molecules have been identified in the extracts such as arbutin, a glycosylated hydroquinone (**Table 2**). Glycosylation is a widespread modification of plant specialized metabolites. It is involved

in various functions, including the regulation of hormone homeostasis, the detoxification of xenobiotics and the biosynthesis and storage of specialized compounds. From a chemical point of view, sugar conjugation results in both increased stability (through the protection of reactive nucleophilic groups) and water solubility (Gachon et al., 2005). Several of these molecules have some interesting biological activity without its sugar molecule. For example, apigenin, a chemical compound of the family of flavones, a subclass of flavonoids, has been studied for its multiple biological activities such as anti-inflammatory and antimicrobial (Akroum et al., 2009; Basile et al., 1999; Funakoshi-Tago et al., 2011; Kukić et al., 2008). The apigenin 6-glucoside and apigenin-diglucoside were identified in our methanol extract (**Table 3**). In few articles, only some glycosylated molecules have also demonstrated antimicrobial activity, for example apigenin 7-glucoside in Kukić et al. (2008) as well as kaempferol-3-O-glucoside in Akroum et al. (2009). Therefore, we cannot exclude the possibility that these molecules may play a role in the antimicrobial activity of the extracts, despite their associate to a sugar moiety.

The antimicrobial properties of the molecules present either in the water or methanol extracts as shown in **Table 4** have been identified before (see reference in **Table 4**), but the mechanisms underlying these properties have seldom been studied. For example, berberine present at 2.27% in the water extract is an alkaloid known as an antimicrobial agent due to its quaternary ammonium salt structure. This compound acts as an antimicrobial by binding minor grooves of DNA and by regulating the gene expression of microorganisms (Yu et al., 2005). In contrast, caffeic acid, listed in a lower proportion in both extracts (0.96% water extract and 0.84% methanol extract), has an antimicrobial mechanism that act on the cell wall and the cytoplasmic membrane of microorganisms (Perumal et al., 2017). There are several mechanisms of action of antimicrobial agents currently known, but the ones involved in white birch bark extracts have yet to be elucidated. Each of the targeted molecules in white birch bark extracts may therefore have different antimicrobial mechanisms and these may have synergistic effects. It is well known that plant extracts are complex mixture of phytochemical compounds, which act synergistically together to achieve antimicrobial effect (Burt, 2004; Cushnie and Lamb, 2011).

The composition of the extracts determined by UPLC-QTOF-MS makes it possible to better understand which molecules present makes it possible to act as an antimicrobial agent. However, it is very important to note that the proportions of each component may vary from one tissue specimen to the other within a single species, and vary also due to other parameters such as harvest time, geographical location, or other environmental conditions (Royer et al., 2012; Vardar-Ünlü et al., 2008). Furthermore, although several samples were pooled, only one method of analysis was performed to identify the compounds present in the extracts (UPLC-QTOF-MS). Hence, it is possible that some volatile compounds have not been identified and may play a role in the antimicrobial activity of the extract. In addition, the percentages of area are relative to the mode of analysis used (positive or negative) as well as the ability of a molecule to ionize easily or not. The compounds were identified by comparing the exact masses (m/z) and retention time (R_t) obtained in a database, these are only potential identities of molecules with respect to a percentage of similarity. The complete lists of all the molecules identified for the water extract and the methanol extract can be found in additional material (Table S1, ANNEXE B).

Until today, the main way to valorize bark residues is to burn them to generate heat and electricity. Therefore, it is important to ensure that the added valorization step, *i.e.* extraction of bioactive compounds from residues, will be more efficient or will not affect energy yield. It is thus primordial that the calorific value of the material before and after the extraction is similar or only slightly modified. For this reason, heating value tests should be carried out on bark residues after extraction. When wood is burned, it is the structural components of the wood that burn and produce heat. The high proportions of lignin, cellulose and hemicellulose (**Figure 1C**) suggest a high calorific value of the material as well as low ash content. Several studies have shown that there was a highly significant linear correlation between the higher heating value of the extractive-free wood and lignin content (Demirbaş, 2001; White, 1987) and another one showed that high ash content in parts of a plant makes it less desirable as fuel (Demirbas, 2002). Despite the fact that some article demonstrates a slight decrease in the calorific value of wood after

extraction, the energy loss is however low compared to the added value of the extracted molecules. The production of high value-added products from white birch bark extract will promote an innovating industrial sector, generating wealth and sustainable jobs, which will encourage wider opportunities to use wood as a renewable crude material (Royer et al., 2012).

Conclusion

To our knowledge, the present study is first to highlight the potential of white birch bark extracts, obtained from sawmill bark residues, as a natural source of antimicrobial agents which could be considered as good candidates for the development of high value products such as new cosmetics, nutraceuticals or sanitary products. The water extract had the best antimicrobial potential followed by methanol extract. In an industrial context, the water extract is to be prioritized because of its low-environmental impact. Using UPLC-QTOF-MS, catechol was identified as one of the main component in white birch bark water extract, and its antimicrobial activity has already been studied, suggesting that catechol could be one of the components contributing to the antimicrobial activity of this extract. However, the extract is a complex mixture of phytochemical compounds, which act certainly synergistically together to achieve antimicrobial effect. These results offer the possibility to valorize the bark residues produced in huge quantities by the Canadian forest industry, using the concept of extractable. In addition, the extractive can be obtained while maintaining the biomass that can subsequently be used to energy production and other applications. Nevertheless, further investigations would be required to determine the cytotoxicity of the extracts, their biological efficacies *in vivo* and their stability in the context of pharmaceutical, cosmetic, food or sanitary formulations.

Acknowledgment

This work was supported by Forêt modèle du Lac-Saint-Jean, Groupe Sani Marc and Coopérative pour la valorisation de la biomasse. The authors gratefully acknowledge Mitacs, the Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au

Québec (CRIBIQ) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for financial support.

The authors would like to thank Simon Barnabé, Patrick Marchand and Dominic Desrosiers for the loan of equipment and access to laboratories, Stephanie Blais and Josée Doucet for handling micro-dilution and extraction. Thanks to Pascal Dubé from the Centre de Recherche Industrielle du Québec (CRIQ) for carrying out the chemical characterization of the extracts.

References

- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., Lalaoui, K., 2009. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 4, 93-96.
- Amábile-Cuevas, C., 2003. New Antibiotics and New Resistance In many ways, the fight against antibiotic resistance is already lost; preventing bacterial disease requires thoughtful new approaches. *American scientist* 91, 138-149.
- Bais, H. P., Walker, T. S., Stermitz, F. R., Hufbauer, R. A., Vivanco, J. M., 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128, 1173-1179.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research* 196, 44-68.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., Cobianchi, R. C., 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52, 1479-1482.
- Berberian, V., Allen, C. e. C. e. R., Sharma, N. e. D., Boyd, D. e. R., Hardacre, C., 2007. A comparative study of the synthesis of 3-substituted catechols using an Enzymatic and a chemoenzymatic method. *Advanced synthesis & catalysis* 349, 727-739.

- Borchardt, J. R., Wyse, D. L., Sheaffer, C. C., Kauppi, K. L., Ehlke, R. G. F. N. J., Biesboer, D. D., Bey, R. F., 2008. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of medicinal plants research* 2, 098-110.
- Bridgeman, T., Darvell, L., Jones, J., Williams, P., Fahmi, R., Bridgwater, A., Barraclough, T., Shield, I., Yates, N., Thain, S., 2007. Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops. *Fuel* 86, 60-72.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Capello, C., Fischer, U., Hungerbühler, K., 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry* 9, 927-934.
- Celhay, C., Mathieu, C. E., Candy, L., Vilarem, G., Rigal, L., 2014. Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study. *Comptes Rendus Chimie* 17, 204-211.
- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A. P., Nautiyal, A. R., 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—A review. *Plants* 6, 16.
- Cheng, X., Deng, J., Zhang, S., Riedl, B., Cloutier, A., 2006. Impact of bark content on the properties of medium density fiberboard (MDF) in four species grown in eastern Canada. *Forest products journal* 56, 64.
- Corder, S. E., 1976. Properties and uses of bark as an energy source. Corvallis, Or.: Forest Research Laboratory, Oregon State University.
- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.
- Cushnie, T. T., Lamb, A. J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 38, 99-107.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 174-181.
- Demirbas, A., 2002. Relationships between heating value and lignin, moisture, ash and extractive contents of biomass fuels. *Energy Exploration & Exploitation* 20, 105-111.

- Demirbaş, A., 2001. Relationships between lignin contents and heating values of biomass. *Energy Conversion and Management* 42, 183-188.
- Ekman, R., 1983. The Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 37, 205-211.
- Farkas, G., Kiraaly, Z., 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Journal of Phytopathology* 44, 105-150.
- Feng, S., Cheng, S., Yuan, Z., Leitch, M., Xu, C., 2013. Valorization of bark for chemicals and materials: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26, 560-578.
- Fukuhara, K., Nakanishi, I., Kansui, H., Sugiyama, E., Kimura, M., Shimada, T., Urano, S., Yamaguchi, K., Miyata, N., 2002. Enhanced radical-scavenging activity of a planar catechin analogue. *Journal of the American Chemical Society* 124, 5952-5953.
- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., Kasahara, T., 2011. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology* 11, 1150-1159.
- Gachon, C. M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P., 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10, 542-549.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P., Pichette, A., 2006. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 6713-6725.
- Gupta, G. K., 2009. Development of bark-based environmental-friendly composite panels. Faculty of Forestry vol. Master of Science in Forestry. University of Toronto, p. 133.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Preparation of samples for compositional analysis. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL.
- Harkin, J. M., Rowe, J. W., 1971. Bark and its possible uses. (Research note FPL; 091): 56 p. 91.

- Jablonsky, M., Nosalova, J., Sladkova, A., Haz, A., Kreps, F., Valka, J., Miertus, S., Frecer, V., Ondrejovic, M., Sima, J., Surina, I., 2017. Valorisation of softwood bark through extraction of utilizable chemicals. A review. *Biotechnology Advances* 35, 726-750.
- Jeong, E.-Y., Jeon, J.-H., Lee, C.-H., Lee, H.-S., 2009. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food Chemistry* 115, 1006-1010.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., Burns, D. T., 1990. Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv+ 464 pp. Price DM 148.00. *Analytica Chimica Acta* 237, 511-512.
- Kedzia, B., Geppert, B., Iwaszkiewicz, J., 1990. Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytotherapie* 6, 7-10.
- Kocaçalışkan, I., Talan, I., Terzi, I., 2006. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61, 639-642.
- Krasutsky, P. A., 2006. Birch bark research and development. *Natural Product Reports* 23, 919-942.
- Krasutsky, P. A., Carlson, R. M., Nesterenko, V. V., Kolomitsyn, I. V., Edwardson, C. F., 2007. Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark. Google Patents.
- Kuiters, A., Sarink, H., 1986. Leaching of phenolic compounds from leaf and needle litter of several deciduous and coniferous trees. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 475-480.
- Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., Soković, M., 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry* 107, 861-868.
- Liu, X., Bi, X. T., 2011. Removal of inorganic constituents from pine barks and switchgrass. *Fuel Processing Technology* 92, 1273-1279.
- McCutcheon, A., Ellis, S., Hancock, R., Towers, G., 1992. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* 37, 213-223.

- McCutcheon, A., Ellis, S., Hancock, R., Towers, G., 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 157-169.
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., Pereira, H., 2012. Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. *Industrial Crops and Products* 36, 395-400.
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., Pereira, H., 2013. Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*. *Industrial Crops and Products* 41, 299-305.
- Moon, H., Rhee, M. S., 2016. Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology* 217, 35-41.
- Mshvildadze, V., Legault, J., Lavoie, S., Gauthier, C., Pichette, A., 2007. Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* 68, 2531-2536.
- O'Connell, M. M., Bentley, M. D., Campbell, C. S., Cole, B. J., 1988. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochemistry* 27, 2175-2176.
- Omar, S., Lemonnier, B., Jones, N., Ficker, C., Smith, M., Neema, C., Towers, G., Goel, K., Arnason, J., 2000. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 161-170.
- Pedieu, R., Riedl, B., Pichette, A., 2009. Properties of mixed particleboards based on white birch (*Betula papyrifera*) inner bark particles and reinforced with wood fibres. *European Journal of Wood and Wood Products* 67, 95-101.
- Perumal, S., Mahmud, R., Ismail, S., 2017. Mechanism of action of isolated caffeic acid and epicatechin 3-gallate from *euphorbia hirta* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacognosy Magazine* 13, S311-S315.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.-L., Oksman-Caldentey, K.-M., 2005. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 8-18.

- Royer, M., Ben Amor, A., Boucher, M.-A., 2016. Les extractibles forestiers. Biosourcé volume 3, 18.
- Royer, M., Houde, R., Viano, Y., Stevanovic, T., 2012. Non-wood Forest Products Based on Extractives-A New Opportunity for the Canadian Forest Industry Part 1: Hardwood Forest Species. *Journal of Food Research* 1, 8.
- Royer, M., Prado, M., García-Pérez, M. E., Diouf, P. N., Stevanovic, T., 2013. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition* 1, 158-167.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., Jabbar, A., 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* 27, 238-254.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., Latha, L. Y., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8.
- Silva, G. G. D., Guilbert, S., Rouau, X., 2011. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Powder Technology* 208, 266-270.
- Sjöström, E., Alén, R., 2013. *Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking*. Springer Science & Business Media.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005a. Determination of ash in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. NREL.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008a. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. NREL.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. NREL.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005b. Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. NREL.
- Vandal, J., Abou-Zaid, M. M., Ferroni, G., Leduc, L. G., 2015. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada. *Pharmaceutical Biology* 53, 800-806.

- Vardar-Ünlü, G., Silici, S., Ünlü, M., 2008. Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1011-1017.
- Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M., 2004. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 52, 1077-1082.
- Webster, D., Taschereau, P., Belland, R. J., Sand, C., Rennie, R. P., 2008. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 140-146.
- White, R., 1987. Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood. *Wood and Fiber Science* 19, 446-452.
- Wink, M., 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 75, 225-233.
- Yu, H.-H., Kim, K.-J., Cha, J.-D., Kim, H.-K., Lee, Y.-E., Choi, N.-Y., You, Y.-O., 2005. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food* 8, 454-461.
- Yubin, J., Miao, Y., Bing, W., Yao, Z., 2014. The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6, 338-345.
- Zhang, T., Wei, X., Miao, Z., Hassan, H., Song, Y., Fan, M., 2016. Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. *Chemistry Central Journal* 10, 47.
- Zhao, G., Yan, W., Cao, D., 2007. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 959-962.

Legends

Table 2.1 Antimicrobial activity of white birch bark extracts against different strains of microorganisms.

Table 2.2 Chemical composition of white birch bark water extract using UPLC-QTOF-MS analyses.

Table 2.3 Chemical composition of white birch bark methanol extract using UPLC-QTOF-MS analyses.

Table 2.4 Compounds present in water and methanol extracts of white birch bark known with antimicrobial activity as reported in the literature.

Table S1. Crude chemical composition of white birch bark water and methanol extract using UPLC-QTOF-MS in positive and negative ionization mode (see in ANNEXE B).

Figure 2.1 Analysis of bark biomass.

Table of the optimal granulometric fraction to be used for the extraction of the bark (A), the graph shows the extractive concentration (g) per 100 gram of bark batch among fraction sizes following extraction with ethanol, water-ethanol and water. The graph (B) represent the percentage of ash in the bark fraction < 3 mm and 3-7 mm. The pie chart (C) represent the analysis of the composition of the bark in fraction > 3 mm and the graph (D) is the extraction yield according to the solvent used.

Figure 2.2 Thin layer chromatography of bark extracts.

Thin layer chromatography of bark extracts with chloroform: methanol (9:1) and visualised under UV 254 nm (A), stained with *p*-anisaldehyde (B) and with FeCl₃ (C). Lane S corresponds to a mixture of standards (P: piperine, V: vanillin, B: betulin, F: ferulic acid, G: glucose). The samples from left to right were extracts from different solvents: water (1), methanol (2), ethanol (3), acetone (4), methylene chloride (5), ethyl acetate (6), chloroform (7), hexane (8), ethanol-water (9) and acid-base (10).

Tables

Table 2.1

Antimicrobial activity of white birch bark extracts against different strains of microorganisms.

Extracts	<i>E. coli</i>		<i>S. enterica</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC ^a	MBC/MFC ^b	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
Water	1.67	– ^c	0.83	–	0.83	–	1.67	1.67
Methanol	–	–	1.67	4.44	–	–	4.44	4.44
Ethanol	–	–	1.67	–	1.67	–	–	–
Acetone	–	–	4.44	–	–	–	–	–
Methylene chloride	0.83	–	1.67	4.44	0.21	0.21	–	–
Ethyl acetate	–	–	1.67	–	–	–	–	–
Chloroform	–	–	1.67	4.44	0.21	0.83	–	–
Hexane	–	–	1.67	–	–	–	–	–
Water-ethanol	1.67	–	1.67	–	1.67	–	4.44	–
Acid-base	4.44	–	1.67	–	–	–	–	–
QAC ^d	2.60	5.21	0.65	0.65	10.42	10.42	5.21	5.21

Extracts	<i>E. faecalis</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
Water	1.67	–	0.83	–	1.67	–	1.11	4.44
Methanol	1.67	4.44	1.67	–	–	–	2.22	–
Ethanol	–	–	1.67	–	–	–	2.22	–
Acetone	–	–	1.67	–	–	–	2.22	–
Methylene chloride	–	–	–	–	–	–	1.11	4.44
Ethyl acetate	–	–	–	–	–	–	2.22	–
Chloroform	–	–	–	–	–	–	1.11	4.44
Hexane	–	–	–	–	–	–	–	–
Water-ethanol	–	–	–	–	–	–	–	–
Acid-base	–	–	2.22	–	1.67	–	2.22	4.44
QAC ^d	2.60	2.60	10.42	10.42	5.21	5.21	2.60	2.60

^a MIC, minimum inhibitory concentration. Values given as mg mL⁻¹.^b MBC/MFC, minimum bactericidal concentration/minimum fungicidal concentration. Values given as mg mL⁻¹.^c Not active at maximum concentration (4.44 mg mL⁻¹)^d QAC: quaternary ammonium cation is use as a positive control (BTC® 2125M-80%). Values given as mg L⁻¹.

Table 2.2
Chemical composition of white birch bark water extract using UPLC-QTOF-MS analyses.

Compounds ^a	R _t ^b	Exact mass (m/z) ^c		Area ^d (%)
		[M+H]	[M-H]	
Phenols				
Epirosmanol	5.08	-	345.1393	5.88
Sakuranetin	5.64	-	285.1237	1.13
Catechol	5.65	-	109.0359	6.47
4-Hydroxybenzaldehyde	6.84	-	121.0385	1.65
Fisetin	9.52	287.1035	-	3.75
Scutellarein	12.41	-	285.0584	2.48
Oleuropein-aglycone	14.61	-	-	0.51
	16.12	-	377.1308	0.67
Kaempferol	15.55	-	285.0992	3.70
	15.57	287.1035	-	2.86
Piceatannol	16.24	-	243.0846	0.53
Terpenoids				
Terpendole C	7.87	520.3510	-	2.35
Artabsin	8.40	249.1232	-	4.43
Confertiflorin	11.10	307.1928	-	0.88
p-Menthane-3,8-diol	11.63	-	171.1150	1.02
Phytuberin	14.30	295.1483	-	1.03
Alkaloids				
Gentianaine	0.98	142.0390	-	2.25
Berberine	4.52	-	335.1533	2.27
Tubulosine	7.53	476.3204	-	2.03
Avenanthramide 2f	13.55	-	329.2584	0.88
Macarpine	14.29	-	391.1157	0.56
(-)-Solenopsin A	23.78	254.2584	-	4.48
Glycosylated molecules				
3-Hydroxyphloretin 2'-O-glucoside	7.16	-	451.1916	0.57
Phlorin	9.51	-	287.0781	1.59
Grandidentatin	9.80	-	423.1843	3.09
	10.15	-	-	2.51
Eriodictyol 7-O-glucoside	10.78	-	449.1708	3.28
	11.93	-	-	3.16
Arbutin	12.20	-	271.0804	3.16
	12.22	273.0878	-	3.59
Acids				
Muconic acid	1.12	-	141.0299	0.69
Caffeic acid	1.19	-	179.0726	0.96
Hydroxycaffeic acid	1.21	-	195.0641	0.59
3-p-Coumaroylquinic acid	5.00	-	337.1743	2.05
5-O-Galloylquinic acid	5.85	-	343.1214	1.03
Feruloyl tartaric acid	6.23	-	325.1221	0.55
	6.54	-	325.1133	0.77
Vanillic acid	6.36	-	167.0478	0.50
p-Coumaric acid	7.59	-	163.0480	3.05
4-Hydroxybenzoic acid	9.14	-	137.0339	3.85
Pisiferic acid	9.21	317.1948	-	0.73
Ellagic acid	13.14	-	301.0882	0.61
Sugars				
L-Rhamnose	0.98	165.0511	-	0.20
(+)-Catechin 3-O-gallate	7.75	-	441.1687	0.72
D-Glucose	34.86	181.0349	-	0.21

Table 2.2 continued

Compounds ^a	R _t ^b	Exact mass (m/z) ^c		Area ^d (%)
		[M+H]	[M-H]	
Others				
4-Nitrophenol	1.02	140.0050	-	0.80
1,4-Naphthoquinone	3.02	-	157.0604	1.20
Marchantin A	8.92	-	439.1857	1.03
	9.33	-	421.1777	2.61
Picrasin C	34.89	-	421.2571	0.50
Myristamide	23.05	228.2430	-	3.02
Heptadecylamine	26.02	256.2760	-	3.87
2-Nitrophenol	34.87	139.9936	-	1.36

^a The compounds were selected on the basis of their relevance and having an % area \geq 0.50. The compounds were determined by comparing the exact masses in a data bank. Potential identity are presented.

^b Retention time (minute).

^c Exact mass depending on the ionization mode of the analysis either positive [M+H] or negative [M-H].

^d The percentage of area is relative to the ionization mode of the analysis used.

Table 2.3
Chemical composition of white birch bark methanol extract using UPLC-QTOF-MS analyses.

Compounds ^a	R _t ^b	Exact mass (m/z) ^c		Area ^d (%)
		[M+H]	[M-H]	
Phenols				
Pentacosyl Resorcinol	7.32	-	459.1974	2.78
Hydroxymatairesinol	7.44	-	373.1544	3.66
Anhydro-secoisolariciresinol	7.99	-	343.1340	1.36
Taxifolin	8.48	-	303.0838	0.82
Ligstroside	9.26	-	523.2272	2.30
Phloridzin	9.40	-	435.1445	2.35
Phloridzin	10.83	-	435.1445	1.44
Dimethylquercetin	13.64	-	329.2446	3.24
Kaempferid	14.20	-	299.1744	3.33
Acacetine	15.69	-	285.0872	3.30
Oleuropein-aglycone	16.26	-	377.1339	0.65
Terpenoids				
Perilloside	11.61	-	313.1478	5.54
Deoxystansioside	14.53	-	295.1493	3.76
Alkaloids				
Annotinine	7.40	276.1790	-	2.35
Methylconiine	10.76	142.1624	-	1.74
Isocorypalmine	11.14	342.2122	-	4.19
Pinidine	11.65	140.1349	-	6.57
Coniine	14.57	128.1771	-	4.95
Glycosylated molecules				
Galloyl glucose	5.47	-	331.1245	1.20
Hydroxyphloretin-glucoside	9.65	-	451.1421	1.12
Apigenin 6-glucoside	10.32	-	431.1400	2.18
Apigenin-diglucoside	11.13	-	593.2709	2.96
Acids				
Ibotenic acid	1.38	159.0468	-	0.61
Caffeic acid	1.55	-	179.0905	0.84
Hydroxybenzoic acid	6.05	-	137.0502	0.57
Hydroxybenzoic acid	9.89	-	137.0389	0.67
Coumaric acid	7.85	-	163.0530	0.78
Valoneic acid dilactone	8.55	-	469.1547	1.15
Chicoric acid	9.16	-	473.1739	1.74
Chicoric acid	9.52	-	473.1739	2.80
Chicoric acid	9.58	-	473.1739	0.68
12-Hydroxydodecanoic acid	9.87	217.1958	-	0.66
Others				
Carbophenothion	11.14	342.9818	-	1.52
Butonate	12.99	326.9941	-	3.73
Asparagusate	13.64	150.9699	-	3.93
Retinal	20.07	285.1934	-	1.41

^a The compounds were selected on the basis of their relevance and having an % area ≥ 0.50 . The compounds were determined by comparing the exact masses in a data bank. Potential identity are presented.

^b Retention time (minute).

^c Exact mass depending on the ionization mode of the analysis either positive [M+H] or negative [M-H].

^d The percentage of area is relative to the ionization mode of the analysis used.

Table 2.4

Compounds present in water and methanol extracts of white birch bark with known antimicrobial activity as reported in the literature.

Compound class	Compound name	Extraction solvent		References
		Water	Methanol	
Phenols	Catechol	+ (6.47) ^a	-	(Jeong et al., 2009; Kocaçalışkan et al., 2006)
	4-Hydroxybenzaldehyde	+ (1.65)	-	(Chang et al., 2001; Friedman et al., 2003)
	Fisetin	+ (3.75)	-	(da Costa et al., 2014; Gabor and Eperjessy, 1966)
	Phloridzin	-	+ (1.44)	(Barreca et al., 2014; Zhang et al., 2016)
	Kaempferol	+ (3.70)	-	(Cai and Wu, 1996; M Calderon-Montano et al., 2011; Tatsimo et al., 2012)
	Piceatannol	+ (0.53)	-	(Plumed-Ferrer et al., 2013; Yim et al., 2010)
Alkaloids	Berberine	+ (2.27)	-	(Aziz et al., 1998; Jeong-Yong et al., 1998; Merkl et al., 2010; Özçelik et al., 2011; Stojković et al., 2013)
Acids	Caffeic acid	+ (0.96)	+ (0.84)	(Aziz et al., 1998; Jeong-Yong et al., 1998; Merkl et al., 2010; Özçelik et al., 2011; Stojković et al., 2013)
	Hydrobenzoic acid	+ (3.85)	+ (0.67)	(Jeong-Yong et al., 1998; Merkl et al., 2010)
	Vanillic acid	+ (0.50)	-	(Aziz et al., 1998; Delaquis et al., 2005; Merkl et al., 2010)
	Coumaric acid	+ (3.05)	+ (0.78)	(Aziz et al., 1998; Lou et al., 2012)
	Pisiferic acid	+ (0.73)	-	(Fukui et al., 1978; Kobayashi et al., 1988)

- not present, + present in the extract

^a% of area in the extract

Figures

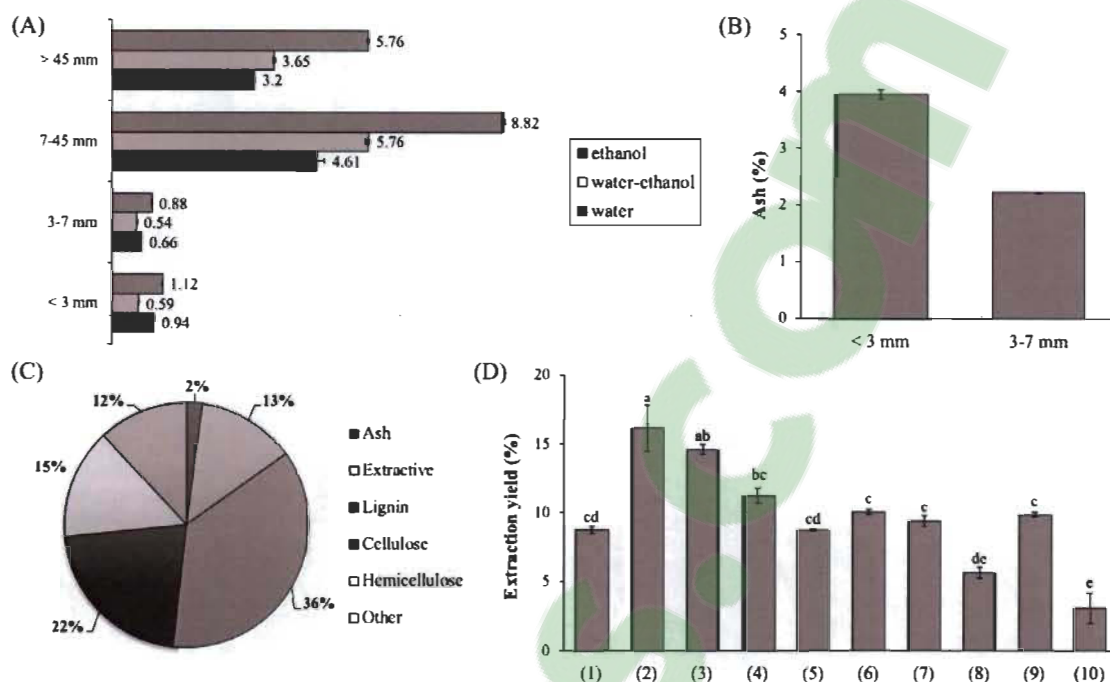


Figure 2.1 Analysis of bark biomass.

Table of the optimal granulometric fraction to be used for the extraction of the bark (A), the graph shows the extractive concentration (g) per 100 gram of bark batch among fraction sizes following extraction with ethanol, water-ethanol and water. The graph (B) represent the percentage of ash in the bark fraction < 3 mm and 3-7 mm. The pie chart (C) represent the analysis of the composition of the bark in fraction > 3 mm and the graph (D) is the extraction yield according to the solvent used: water (1), methanol (2), ethanol (3), acetone (4), methylene chloride (5), ethyl acetate (6), chloroform (7), hexane (8), water-ethanol (9) and acid-base (10). The extracts having the same letter present no significant differences ($p < 0.05$) according to Tukey statistical test.

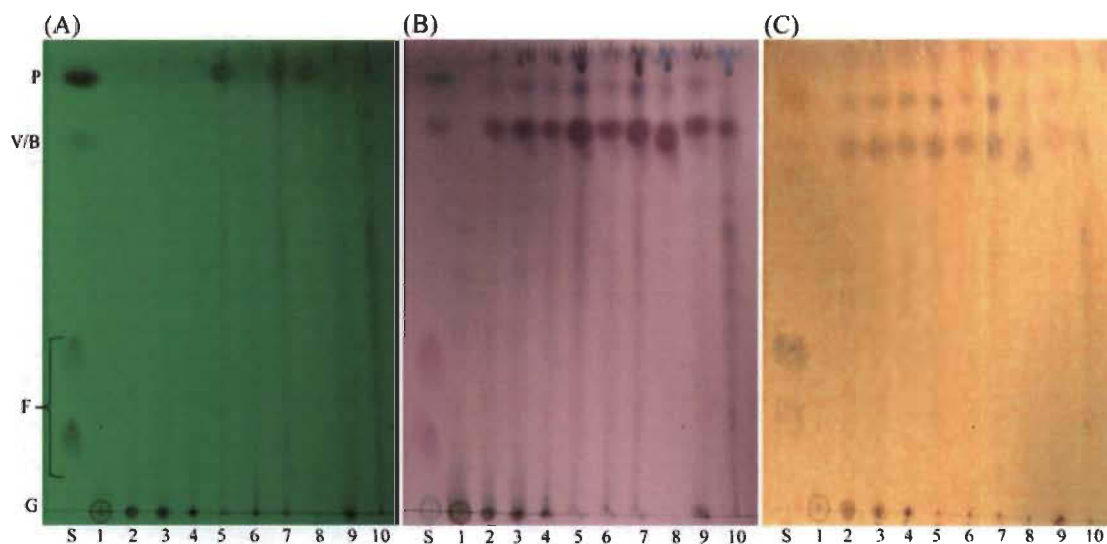


Figure 2.2 Thin layer chromatography of bark extracts.

Thin layer chromatography of bark extracts with chloroform: methanol (9:1) and visualised under UV 254 nm (A), stained with *p*-anisaldehyde (B) and with FeCl_3 (C). Lane S corresponds to a mixture of standards (P: piperine, V: vanillin, B: betulin, F: ferulic acid, G: glucose). The samples from left to right were extracts from different solvents: water (1), methanol (2), ethanol (3), acetone (4), methylene chloride (5), ethyl acetate (6), chloroform (7), hexane (8), ethanol-water (9) and acid-base (10).

CHAPITRE III

DISCUSSION

Au Québec, l'industrie forestière est une industrie dominante qui représente une grande partie de l'économie. L'une des raisons causant cette grande popularité du secteur forestier est l'immense disponibilité de la ressource, puisque le territoire québécois est recouvert à 44,8 % de forêt. Toutefois, depuis plusieurs années, l'industrie vit une certaine crise qui engendre la chute de prix du bois d'œuvre et du papier. C'est pourquoi le ministère des ressources naturelles et de la faune du Québec a mis en place plusieurs stratégies dont celle de 2008 intitulée « La forêt, pour construire le Québec de demain » (Ministère des ressources naturelles, 2008). Cette stratégie était axée sur le développement de l'industrie forestière ayant comme but de diversifier les marchés. L'une des avenues proposait de se tourner vers la fabrication de PHVA. Dans cette même optique, il est essentiel de valoriser tous les résidus forestiers engendrés suite à la transformation du bois tels que les écorces. Les écorces sont présentes en très grande quantité sur notre territoire et celles-ci constituent un important réservoir d'agents thérapeutiques, cosmétiques, sanitaires et bioalimentaires. En effet, une espèce végétale peut renfermer au-delà d'une centaine de métabolites spécialisés de natures et de structures différentes ce qui représente un assortiment important de molécules bioactives. Le spectre d'activité de celles-ci est plutôt étendu (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, etc.) (Royer et al., 2016).

Le bouleau blanc est une espèce très abondante dans les forêts boréales du Québec. On retrouve alors une grande quantité de ses résidus (écorces) qui peuvent être valorisés de différentes façons. L'extraction des molécules de son écorce représente une bonne voie de valorisation, puisque ces extractibles pourront être ajoutés à la formulation de divers produits. Étant donné que de nos jours, la résistance des microorganismes aux agents antimicrobiens est une problématique mondiale, il est primordial d'envisager de nouvelles

sources d'agents antimicrobiens efficaces afin de contrer ce problème. C'est pourquoi, investiguer les produits naturels extraits de plantes et même d'écorces d'arbres représente une alternative intéressante.

À ce jour, peu d'études phytochimiques complètes ont porté sur les tissus résiduels du bouleau blanc. Par ailleurs, elles ont encore moins signalé la présence d'activités antimicrobiennes des molécules provenant de son écorce. Ces travaux de recherche ont donc pour objectif principal de caractériser les extraits d'écorces du bouleau blanc (*Betula papyrifera*) et de déterminer leur potentiel antimicrobien. Ces résultats de recherche ont pour but de démontrer le potentiel antimicrobien des extraits du bouleau blanc qui pourront être intégrés dans la formulation de PHVA.

Plusieurs retombées sont envisageables suite aux résultats de recherche obtenus. Ces résultats supportent l'industrie forestière dans ses projets de valorisation des résidus forestiers puisqu'ils démontrent le grand intérêt des extractibles pour différentes industries, donnant ainsi un élan à notre industrie forestière. Plusieurs secteurs industriels pourront donc profiter de l'activité antimicrobienne des extraits du bouleau blanc. Par exemple, l'industrie sanitaire qui pourrait intégrer les extraits dans la formulation de désinfectants ou d'assainissements, l'industrie cosmétique comme agent de conservation et plusieurs autres. L'utilisation d'extractibles comme agent antimicrobien s'imbrique parfaitement dans le tournant « vert » des nouveaux produits et des consommateurs, permettant ainsi de diminuer l'utilisation de produits chimiques synthétiques ayant des effets néfastes pour l'environnement.

3.1 Retour sur les résultats de recherche

Plusieurs résultats intéressants ont émergé du projet de recherche, ceux-ci ont bien été identifiés et expliqués dans l'article présenté au chapitre ii. Cette section fera un récapitulatif de ces résultats tout en y ajoutant les limitations de ceux-ci.

Premièrement, plusieurs analyses préliminaires ont été réalisées sur les résidus forestiers obtenus d'une scierie du Lac-Saint-Jean afin de se familiariser avec la matière première qui a été utilisée au cours de l'étude. Le tamisage des résidus en différentes fractions granulométriques suivi de l'extraction par solvants de ces fractions ont permis de déterminer la grosseur optimale de résidus à conserver. La granulométrie optimale est celle permettant d'extraire un maximum de composés. Pour ce qui est des écorces du bouleau blanc, il s'est avéré que les résidus > 3 mm avaient un plus grand rendement d'extraction peu importe le solvant utilisé (éthanol, eau et eau-éthanol). De plus, suite à l'analyse de la teneur en cendre, il a été montré que la fraction < 3 mm comportait une plus grande quantité de cendre. C'est pourquoi cette fraction a été éliminée préalablement aux autres analyses, permettant ainsi d'éliminer le plus possible la matière inorganique et certains contaminants tels que du sable. Ces résultats comportent certaines limitations puisque malgré l'élimination des résidus < 3 mm, il est fort possible que des contaminants soient tout de même présents tels que des morceaux de bois, du sable ou de la terre. Ceux-ci peuvent causer des problèmes dans les procédés industriels d'extraction. De plus, puisque les écorces sont habituellement entreposées à l'extérieur des scieries, certains contaminants environnementaux peuvent être présents tels que des polluants atmosphériques. C'est pourquoi un contrôle qualité de la composition chimique des extractibles devrait être envisagé sur chaque lot d'écorce.

Les dix extractions des écorces réalisées à l'aide de différents solvants ou techniques d'extraction montrent que les extraits au méthanol (16,10 %) et à l'éthanol (14,56 %) permettent d'obtenir un plus grand rendement en extractible. Ces deux extractions ont été réalisées au moyen d'un extracteur de Soxhlet durant un reflux de 7h. Plusieurs avantages sont reliés à cette technique tels que le fait que le cycle de reflux se répète indéfiniment jusqu'à épuisement complète du solide sans intervention. Le résultat équivaut à une série de macérations successives, sans un grand nombre de manipulations. De plus, son emploi permet d'utiliser de petites quantités de solvants ce qui est avantageux. Par ailleurs, le solvant qui se condense est toujours pur. La solubilisation de la substance est donc favorisée grâce à de meilleurs coefficients de partage (Luque de Castro and García-Ayuso, 1998). Toutefois, l'extraction par Soxhlet peut présenter quelques limitations. Par

exemple, la taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable. D'autre part, l'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques, modifiant ainsi l'activité biologique de celles-ci. L'utilisation de chaleur pour l'extraction des extraits et l'évaporation des solvants devrait être à minimiser. L'utilisation d'un extracteur à solvant accéléré (DionexTM ASETM 350, ThermoFisher) tel qu'utilisé pour l'extraction à l'eau, est à privilégier puisqu'il utilise des solvants liquides organiques et aqueux à des pressions élevées afin d'augmenter l'efficacité du processus d'extraction. Une température accrue accélère la cinétique d'extraction, et une pression élevée maintient le liquide du solvant au-dessus de son point d'ébullition, assurant ainsi des extractions rapides et sûres. De plus, il est possible de mettre de plus grandes quantités d'écorces (1-100 g), il permet l'extraction sans surveillance jusqu'à 24 échantillons et il utilise 50 à 90 % moins de solvant par rapport à d'autres méthodes. Par contre, pour la sécurité, cet appareil doit être employé sous une hotte ou relié à un système de ventilation lorsque des solvants volatils sont utilisés. C'est pour cette raison qu'au cours de ces travaux de recherche, cette technique d'extraction a seulement été utilisée avec de l'eau. Ces techniques sont davantage utilisées en laboratoire afin de générer de petits volumes d'extrait. D'autres techniques d'extraction devraient être envisagées pour des extractions à plus grande échelle dans une usine. Il existe différentes techniques industrielles dont l'extraction par fluide supercritique qui utilise un fluide supercritique tel que le dioxyde de carbone (CO₂) comme solvant d'extraction. Par contre, cette technique permet d'extraire des composés non-polaires puisque le CO₂ est apolaire. De plus, les coûts de l'investissement et d'opération sont plus élevés que ceux de l'extraction par liquide. Ceci résulte surtout du besoin de la pression élevée lors de l'étape d'extraction. Toutefois, l'extraction par liquide pressurisé ou par solvant accéléré est souvent utilisée en milieu industrielle. Des montages avec de plus grandes quantités d'échantillons sont utilisés. Comparée aux techniques d'extraction conventionnelles (Soxhlet, etc.), l'extraction par liquide pressurisé est plus rapide, la consommation de solvants est plus faible et si besoin des températures plus élevées peuvent être utilisées.

Pour ce qui est de l'activité antimicrobienne des extraits, il a été montré que l'extrait d'écorce de bouleau blanc à l'eau a une meilleure efficacité puisqu'il inhibe la croissance des huit microorganismes étudiés. De plus, il a un effet bactéricide sur deux d'entre eux, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'extrait au méthanol a aussi des résultats intéressants. Il inhibe la croissance de cinq microorganismes (*S. enterica*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *A. niger* et *S. cerevisiae*) et a un effet bactéricide sur *S. enterica*, *S. aureus* et *E. faecalis*. La méthode utilisée afin de déterminer l'activité antimicrobienne est basée sur la micro-dilution en bouillon. Cette procédure comporte plusieurs avantages tels que l'utilisation d'une faible quantité de réactifs puisque la réaction est réalisée dans des microplaques de 96 puits. De plus, c'est une méthode standardisée approuvée par la « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI) qui est facilement reproductible. Toutefois, plusieurs facteurs influencent la valeur de MIC déterminée. Par exemple, le nombre de colonie de départ, le type de milieu de culture, le temps d'incubation et la méthode de préparation des inocula. C'est pourquoi, afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, il est primordial que tous ces paramètres soient les mêmes pour chacune des expériences. Cela permet ainsi de pouvoir comparer les résultats obtenus entre eux. Dans l'article présenté, un colorant a été utilisé afin de détecter la croissance ou l'inhibition des microorganismes. Ce colorant est le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) (structure #5, ANNEXE A). Les microorganismes métaboliquement actifs convertissent l'INT en un composé coloré mauve, l'INT-formazan (structure #6, ANNEXE A). Il permet donc de visualiser l'activité déshydrogénase des microorganismes. Par contre, puisque les extraits d'écorce étudiés ont une légère coloration, il est plus difficile de distinguer le changement de couleur pour certains extraits plus colorés. Plusieurs sels de tétrazolium peuvent être utilisés comme colorant d'oxydoréduction en histochimie et biochimie. Il aurait donc été possible d'utiliser un autre sel tel que le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC) qui forme un composé formazan fluorescent (Smith and McFeters, 1997). Ainsi, la MIC aurait pu être détectée à l'aide de la fluorescence des puits ayant une activité respiratoire cellulaire.

Afin de caractériser les extraits ayant des propriétés antimicrobiennes, l'UPLC-QTOF-MS a été utilisé. Cet appareil a permis d'obtenir une identification potentielle des

molécules présentes dans les extraits à l'eau et au méthanol. Les résultats qui ressortent de cette analyse sont la grande présence de composés phénoliques et d'acides organiques dans les deux extraits. Entre autres, le catéchol est un polyphénol présent dans l'extrait à l'eau qui a fortement été étudié pour ses propriétés antimicrobiennes (Jeong et al., 2009; Kocaçalışkan et al., 2006). Plusieurs avantages sont associés à l'utilisation d'un UPLC-QTOF-MS pour la caractérisation. Premièrement, l'emploi d'un UPLC à la place d'un HPLC (chromatographie liquide à haute performance) par exemple, permet d'obtenir une meilleure résolution, une plus grande vitesse d'analyse, une plus grande sensibilité et une diminution de la quantité de solvant utilisé. Par la suite, l'utilisation du QTOF-MS comme analyseur permet d'avoir une grande exactitude sur la masse des composés détectés et une haute résolution. Par contre, les résultats obtenus se limitent à quelques paramètres dont la sensibilité de l'appareil utilisé qui est de 1 ppm. Ainsi, tous les composés moins concentrés que 1 ppm n'ont pas pu être détectés. Par contre, puisque l'on tente d'identifier les composés qui procurent l'activité antimicrobienne aux extraits, les composés en très faible quantité sont donc moins intéressants à identifier. Une limitation importante liée à la caractérisation est le degré d'identification entre la masse obtenue et celle associée à la banque de données. Celle-ci correspond à la tolérance du rapport masse sur charge (m/z) qui est sélectionnée sur le logiciel MZmine 2. De plus, ce paramètre est additionné au degré de confiance de l'appareil qui correspond dans notre cas à 3 ppm. C'est pourquoi le dernier chiffre après la virgule de la masse exacte comporte une plus grande incertitude. Il est donc important de comprendre que ce sont des identifications potentielles de molécules et que les formules chimiques sont au contraire très précises. Il y a plus de confiance sur la formule, car elle provient d'un calcul, tandis que l'identification provient de banques de données. Par ailleurs, les banques de données utilisées pour l'identification des molécules sont incomplètes et les métabolites spécialisés sont assez rares ce qui n'est pas idéal pour l'identification de m/z provenant d'échantillon végétal non-modèle. Malgré tout, pour prouver hors de tout doute l'identification, il faudra ajouter d'autres techniques d'analyse telles que la spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire), l'infrarouge ou l'ultraviolet-visible (UV). De plus, la fabrication d'une banque de données avec le même appareil que celui de l'analyse, grâce à des standards commerciaux, permettrait de s'assurer de l'identification des molécules. Puisque la banque de données serait réalisée

avec les mêmes paramètres que l'analyse, le degré de confiance de l'identification augmenterait. Par contre, l'achat de standards est plutôt dispendieux et la confection d'une banque de données est une tâche qui peut être très longue.

3.2 Perspectives du projet de recherche

Ce mémoire présente, à notre connaissance, la première étude démontrant le potentiel antimicrobien des écorces du bouleau blanc jumelé avec la caractérisation de ses composés non-volatils. Différentes pistes sont encore à approfondir afin de pouvoir utiliser les extraits d'écorce comme agent antimicrobien dans des produits commerciaux. De plus, il y a encore très peu de données sur la toxicité de ces extraits sur la santé humaine. Plusieurs analyses permettraient donc d'approfondir le sujet.

D'abord, comme il a été montré dans l'article, les extraits d'écorce de bouleau blanc à l'eau et au méthanol ont une meilleure efficacité antimicrobienne que les autres extraits. Tous les extraits analysés correspondent à des extraits bruts, c'est-à-dire que le processus d'extraction a été effectué à l'aide d'un seul solvant, sans étapes de purification. Toutefois, il aurait été intéressant d'utiliser des techniques simples afin de fractionner les extraits en des fractions grossières afin de cibler les groupes de molécules ayant une activité antimicrobienne. Par la suite, l'activité antimicrobienne des différentes fractions comprenant quelques molécules aurait pu être évaluée pour ainsi essayer d'augmenter l'efficacité antimicrobienne. L'article présente plus de 80 composés détectés dans l'extrait à l'eau et au méthanol. Une méthode de fractionnement permettrait donc de cibler des familles de molécules. Il a été montré par différentes études qu'à l'intérieur d'un extrait ayant une multitude de molécules, des effets synergiques pouvaient être présents augmentant ainsi l'efficacité antimicrobienne (Burt, 2004; Cushnie and Lamb, 2011). Toutefois, la présence d'effets antagonismes a aussi été remarquée. Le fait de séparer certaines molécules pourrait éviter ce genre d'effet. Une méthode simple et efficace pour fractionner les extraits bruts est l'utilisation de la chromatographie préparative. Cette méthode a déjà été utilisée dans différents articles dont certains séparaient des extraits de plantes (Butterweck et al., 2000; Saleem et al., 2002). Tout comme la chromatographie

analytique (ex. HPLC), la chromatographie préparative est une technique de séparation qui repose essentiellement sur les mêmes principes théoriques. La seule différence est qu'en chromatographie préparative, un appareil collecteur est lié à l'extrémité de la colonne permettant de recueillir les différentes fractions qui composent le mélange introduit. De plus, l'utilisation d'une colonne chromatographique de plus gros diamètre permettrait de séparer de grandes quantités d'extraits en même temps. D'un point de vue industriel, ce genre de chromatographie ne serait pas rentable en raison des trop faibles quantités d'extraits obtenues malgré l'utilisation d'une grosse colonne à l'intérieur de l'appareil. Par contre, il serait envisageable de transférer la méthode de fractionnement sur de grandes colonnes chromatographiques industrielles.

Tout au long des travaux de recherche, il a été question de valoriser les écorces du bouleau blanc. Présentement au Québec, la valorisation des écorces se fait grâce aux usines de cogénération où la combustion des résidus est effectuée afin de générer de la chaleur et de l'électricité. Le présent projet propose de venir extraire les composés qui se retrouvent dans les cellules des écorces avant de les envoyer à la cogénération pour être brûlés. Une des perspectives du projet est de venir mesurer le pouvoir calorifique des résidus avant et après leur extraction afin de s'assurer qu'il n'ait pas ou peu de perte d'efficacité du combustible. L'utilisation d'un calorimètre permettrait de mesurer ces valeurs (Naik et al., 2010). Il est certain que l'utilisation d'un solvant pour l'extraction vient augmenter le taux d'humidité des écorces. Pour cette raison, une étape de séchage avant la combustion serait envisageable.

Tel que mentionné dans l'article, les écorces ont été recueillies à l'hiver 2016 au Lac-Saint-Jean auprès des industries T.-L. Tremblay, une scierie de Ste-Monique. Ainsi tous les résultats présentés dans l'article reposent sur un seul lot d'écorce sans variation. Par contre, plusieurs études démontrent que de nombreux facteurs peuvent faire varier la teneur et la composition en extractible tels que l'âge, la saison et le lieu de récolte (Crozier et al., 2008). Il serait donc intéressant de déterminer la composition et la teneur en extractible en variant ces trois paramètres. Cela permettrait de s'assurer qu'importe l'âge, le temps de l'année et le lieu de récolte du bouleau blanc, les molécules

antimicrobiennes de son écorce sont toujours présentes. La composition pourrait être mesurée à l'aide d'un HPLC. En effet, il serait possible de déterminer la présence ou l'absence de différents pics à des temps de rétention précis de certaines molécules antimicrobiennes dans plusieurs lots d'écorce. De plus, l'aire sous chacun des pics donnerait une idée de l'abondance relative des composés en comparaison à un standard interne (Griffé, 1996). Grâce à cette technique, il serait possible de s'assurer de la reproductibilité et de la normalisation des extraits.

Comme il a été mentionné dans l'introduction, il existe une variété de microorganismes. Certains sont plus difficiles à irradier que d'autres et quelques-uns peuvent avoir une résistance à des antibiotiques connus. Par exemple, la souche bactérienne SARM est l'une des causes les plus fréquentes d'infections associées aux soins de santé au Canada de même que les ERV sont responsables de diverses infections pouvant se produire dans les voies urinaires, le sang ainsi que les plaies chirurgicales des patients hospitalisés (Agence de la santé publique du Canada, 2016). Les travaux de recherche présentés se sont davantage concentrés sur les microorganismes qui étaient les plus abondants dans l'industrie agro-alimentaire. De plus, les huit microorganismes utilisés ont été choisis en raison de leur diversité (bactéries à Gram + et Gram -, champignons et levures), permettant ainsi de cibler des agents antimicrobiens qui visent simultanément différents microorganismes. En raison de la disponibilité des souches microbiennes, l'étude n'a pas été réalisée sur les souches résistantes. Il serait donc intéressant de déterminer si les extraits de bouleau blanc sont efficaces contre différentes souches résistantes à des antibiotiques. Plusieurs études ont été réalisées sur l'activité antimicrobienne d'extraits de plantes sur des microorganismes résistants (Ahmad and Beg, 2001; Cowan, 1999). Par exemple, Nascimento et al. (2000) ont montré l'efficacité de diverses plantes dans lesquelles les potentiels antimicrobiens les plus élevés ont été observés chez les extraits de *Syzygium aromaticum* (Giroflie) et de *Syzygium cumini* (Jamelonier). Ceux-ci inhibaient respectivement 64,2 et 57,1 % des micro-organismes testés, avec une activité plus élevée contre les bactéries résistantes aux antibiotiques (83,3 %).

Finalement, tout dépendant des applications qu'aura l'agent antimicrobien, la cytotoxicité des extraits devra être évaluée. Pour ce faire, différentes techniques peuvent être utilisées. Premièrement, l'évaluation de la toxicité des extraits sur des lignées cellulaires pourrait être réalisée par une méthode simple de cytométrie en flux. L'iodure de propidium est utilisé comme colorant fluorescent qui ne pénètre que les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la nécrose). Ce réactif est un agent intercalant des acides nucléiques présent dans l'ADN. Ainsi, la mesure de la fluorescence permet de déduire le pourcentage de cellules mortes après différents traitements appliqués sur les lignées cellulaires. Plusieurs études utilisent cette technique pour évaluer la cytotoxicité d'extraits végétaux (Saleem et al., 2002; Tavakkol-Afshari et al., 2008). Par contre, il existe d'autres méthodes qui ne nécessitent pas l'utilisation de la cytométrie en flux, donc moins coûteuses. Par exemple, le dosage MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) qui est une expérience de viabilité de lignées cellulaires (Hansen et al., 1989; Lee et al., 2003; Mackeen et al., 2000). Cette analyse colorimétrique est basée sur la capacité des enzymes mitochondriales, succinates déshydrogénases présentes dans les cellules vivantes, à réduire le substrat MTT soluble dans l'eau en un composé formazan, insoluble et coloré. Suite à cette réaction, ce changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie. Puisque la réduction du MTT ne peut se produire que dans les cellules métaboliquement actives, le niveau d'activité est une mesure de la viabilité des cellules. Cette mesure peut donc être réalisée suite à différents traitements sur les cellules dont la mise en contact des extraits d'écorce à des temps précis.

3.3 Conclusion

La présente étude a mis en évidence le potentiel des extraits d'écorce issus du bouleau blanc en tant qu'agent antimicrobien naturel. Ceux-ci peuvent être considérés comme de bons candidats pour le développement de nouveaux produits à haute valeur ajoutée tels que des produits cosmétiques, nutraceutiques et même sanitaires. L'extrait aqueux possède le meilleur potentiel antimicrobien suivi par l'extrait au méthanol. Dans un contexte industriel, l'extrait à l'eau serait priorisé en raison de son impact

environnemental nul et de son faible coût. Suite à une caractérisation chimique à l'aide de l'UPLC-QTOF-MS, le catéchol a été identifié comme l'un des composants dominants dans l'extrait aqueux d'écorce de bouleau blanc. Puisque dans la littérature, ce composé a déjà été étudié pour son activité antimicrobienne, il est suggéré que le catéchol est l'une des molécules responsables de l'activité antimicrobienne de cet extrait. Cependant, il ne faut pas oublier que les extraits sont des mélanges complexes de composés phytochimiques, ils peuvent donc agir ensemble pour créer des effets de synergie afin d'obtenir une activité antimicrobienne.

Ces résultats offrent la possibilité de valoriser les résidus d'écorce produits en grande quantité par l'industrie forestière québécoise, en utilisant le concept d'extractible. En outre, une étape de valorisation des écorces de bouleau blanc pourrait être ajoutée à la chaîne de valeur avant d'envoyer les résidus vers les usines de cogénération, où ils seront brûlés pour générer de la chaleur et de l'énergie. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour déterminer la cytotoxicité des extraits, leur efficacité biologique *in vivo* et leur stabilité dans le contexte de formulations cosmétiques, alimentaires ou sanitaires. Par ailleurs, la détermination de l'innocuité des extraits demeure une exigence très importante pour leur utilisation future.

RÉFÉRENCES

- Agence de la santé publique du Canada, 2016. Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens.
- Ahmad, I., Beg, A. Z., 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 113-123.
- Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.-M., Chekir-Ghedira, L., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry* 116, 258-264.
- Arct, J., Pytkowska, K., 2008. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology* 26, 347-357.
- Arnason, T., Hebda, R. J., Johns, T., 1981. Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany* 59, 2189-2325.
- Barzic, A. I., Ioan, S., 2015. Antibacterial drugs—From basic concepts to complex therapeutic mechanisms of polymer systems. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. InTech.
- Black, M. J., 1980. Algonquin Ethnobotany: An interpretation of aboriginal adaptation in southwestern Quebec. Musée National de l'Homme. Collection Mercure. Division d'Ethnologie. Service Canadien d'Ethnologie. Dossier Ottawa, 1-243.
- Blay, P., Thibault, P., Thiberge, N., Kiecken, B., Lebrun, A., Mercure, C., 1993. Analysis of taxol and related taxanes from *Taxus canadensis* using liquid chromatography combined with mass spectrometry or tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 7, 626-634.
- Bonafede, M., Rice, L. B., 1997. Emerging antibiotic resistance. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 130, 558-566.
- Buckingham, J., 2007. *Dictionary of Natural Products*. Chapman and Hall/CRC, London.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.

- Busserolles, J., Gueux, E., Balasinska, B., Piriou, Y., Rock, E., Rayssiguier, Y., Mazur, A., 2006. *In vivo* antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 76, 22-27.
- Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A., Winterhoff, H., 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica* 66, 3-6.
- Calliste, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., Duroux, J.-L., 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3321-3327.
- Campagna, M., 1996. Le cycle du carbone et la forêt : de la photosynthèse aux produits forestiers. Ministère des ressources naturelles, Direction de l'environnement forestier, Service de l'évaluation environnementale.
- Centre québécois de valorisation des biotechnologies, 2014. Étude - Extractibles forestiers : utilisations potentielles, marchés et pistes d'action pour le Québec.
- Chen, Y., Geurts, M., Sjollem, S. B., Kramer, N. I., Hermens, J. L., Droge, S. T., 2014. Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: How test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 606-615.
- Christen, V., Faltermann, S., Brun, N. R., Kunz, P. Y., Fent, K., 2017. Cytotoxicity and molecular effects of biocidal disinfectants (quaternary ammonia, glutaraldehyde, poly (hexamethylene biguanide) hydrochloride PHMB) and their mixtures *in vitro* and in zebrafish eleuthero-embryos. *Science of the Total Environment* 586, 1204-1218.
- Coma, V., 2013. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polímeros* 23, 287-297.
- Conly, J., 2002. Antimicrobial resistance in Canada. *Canadian Medical Association Journal* 167, 885-891.
- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.

- Csermely, P., Agoston, V., Pongor, S., 2005. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 178-182.
- Cushnie, T., Hamilton, V., Chapman, D., Taylor, P., Lamb, A., 2007. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1562-1567.
- Cushnie, T. T., Lamb, A. J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 99-107.
- Dewick, P. M., 2009. Medicinal natural products: a biosynthetic approach In: Ltd., J. W. a. S. (Ed.).
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., Cloutier, A., 2009. Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood Science and Technology* 43, 457-470.
- Dorman, H., Deans, S., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- Gautam, R., Jachak, S. M., 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews* 29, 767-820.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P., Pichette, A., 2006. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 6713-6725.
- Gerson, E. A., Kelsey, R. G., 1999. Piperidine alkaloids in nitrogen fertilized *Pinus ponderosa*. *Journal of Chemical Ecology* 25, 2027-2039.
- Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., Lacroix, M., 2016. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology* 66, 332-339.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilonis, A., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina* 47, 137-146.
- Goetz, P., 2007. Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie* 5, 212-217.
- Gould, M. N., 1997. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environmental Health Perspectives* 105, 977.

- Griffé, M., 1996. Chimie: Edition 2 - 2e éd. revue et corrigée. Presses universitaires de Namur.
- Gyawali, R., Ibrahim, S. A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46, 412-429.
- Hammer, K., Carson, C., Riley, T., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* 95, 853-860.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods* 119, 203-210.
- Hesse, M., 2002. Alkaloids: nature's curse or blessing? John Wiley & Sons.
- Hopkins, W. G., 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 565-573.
- Iranshahy, M., Quinn, R. J., Iranshahi, M., 2014. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *RSC Advances* 4, 15900-15913.
- Jacoby, G. A., Archer, G. L., 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine* 324, 601-612.
- Jenkins, W. H., 1939. Notes on the hunting economy of the Abitibi Indians. Catholic University of America.
- Jeong, E.-Y., Jeon, J.-H., Lee, C.-H., Lee, H.-S., 2009. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food Chemistry* 115, 1006-1010.
- Ju, E. M., Lee, S. E., Hwang, H. J., Kim, J. H., 2004. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sciences* 74, 1013-1026.
- Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., Bryant, J., Sorsa, S., Keinänen, M., Sikanen, H., 1996. Chemical diversity of several *Betulaceae* species: comparison of phenolics and terpenoids in northern birch stems. *Trees* 11, 16-22.

- Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., Tahvanainen, J., 1999. Taxonomic implications of phenolic variation in leaves of birch (*Betula* L.) species. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 243-254.
- Kocaçalışkan, I., Talan, I., Terzi, I., 2006. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61, 639-642.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8, 423.
- Krasutsky, P. A., 2006. Birch bark research and development. *Natural Product Reports* 23, 919-942.
- Krasutsky, P. A., Carlson, R. M., Nesterenko, V. V., Kolomitsyn, I. V., Edwardson, C. F., 2007. Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark. *Google Patents*.
- Lacey, L., 1977. Micmac Indian medicine: a traditional way of health. *Formac*, 1977.
- Lai, P., Roy, J., 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1451-1460.
- Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- Lavoie, J.-M., Stevanovic, T., 2006. Yield and composition of lipophylic extracts of yellow birch (*Betula alleghaniensis Britton*) as a function of wood age and aging under industrial conditions. *Holzforschung* 60, 184-189.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J.-S., Jeong, H.-S., Kim, J. H., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences* 73, 167-179.
- Liwa, A. C., Jaka, H., 2015. Antimicrobial resistance: Mechanisms of action of antimicrobial agents. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, A. Méndez-Vilas, Ed., Formatex Research Center.
- Lohner, K., 2009. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics* 28, 105-116.
- Lorian, V., 2005. *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Luque de Castro, M. D., García-Ayuso, L. E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369, 1-10.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses Polytechniques.
- Mackeen, M. M., Ali, A. M., Lajis, N. H., Kawazu, K., Hassan, Z., Amran, M., Habsah, M., Mooi, L. Y., Mohamed, S. M., 2000. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 395-402.
- McManus, M. C., 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy* 54, 1420-1433.
- Melillo, J., Callaghan, T., Woodward, F., Salati, E., Sinha, S., 1990. Effects on ecosystems. *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment*, 283-310.
- Ministère des ressources naturelles, d. l. f. e. d. p. d. Q., 2008. Document synthèse du Livre vert « La forêt pour construire le Québec de demain ». Québec.
- Ministère des ressources naturelles, d. l. f. e. d. p. d. Q. M., 2016. Milieu forestier.
- Ministère des ressources naturelles et de la faune du Québec (MRNF), 2012. Stratégie 2012-2017 pour transformer l'industrie québécoise des produits forestiers. Gouvernement du Québec.
- Ministère des ressources naturelles; de la faune et des parcs du Québec (MRNFP), 2009. Estimés de la disponibilité de la biomasse forestière par région administrative du Québec en 2007-2008, forêts publiques et privées.
- Ministère des ressources naturelles; de la faune et des parcs du Québec (MRNFP), 2016. Produits issus des industries de première, deuxième et troisième transformation.
- Ministère du Développement durable; de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC), 2015. Stratégie québécoise sur les pesticides. Agir ensemble pour protéger la santé, les pollinisateurs et l'environnement.
- MRNFP, 2013. Biomasse Forestière. In: Québec, R. n. d. (Ed.), *Le nouveau régime forestier*.

- Mshvildadze, V., Legault, J., Lavoie, S., Gauthier, C., Pichette, A., 2007. Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* 68, 2531-2536.
- Naik, S., Goud, V. V., Rout, P. K., Jacobson, K., Dalai, A. K., 2010. Characterization of Canadian biomass for alternative renewable biofuel. *Renewable Energy* 35, 1624-1631.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31, 247-256.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., Blanco, A. R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56, 519-523.
- O'Connell, M. M., Bentley, M. D., Campbell, C. S., Cole, B. J., 1988. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochemistry* 27, 2175-2176.
- Omar, S., Lemonnier, B., Jones, N., Ficker, C., Smith, M., Neema, C., Towers, G., Goel, K., Arnason, J., 2000. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 161-170.
- Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T., Yeşilada, E., 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research* 164, 545-552.
- Patocka, J., 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine* 1, 7-12.
- Pichette, A., Legault, J., Gauthier, C., 2008. Triterpenes derivatives and uses thereof as antitumor agents or anti-inflammatory agents. Google Patents.
- Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.
- Pimchan, T., Cooper, C. J., Eumkeb, G., Nilsson, A. S., 2018. *In vitro* activity of a combination of bacteriophages and antimicrobial plant extracts. *Letters in Applied Microbiology* 66, 182-187.

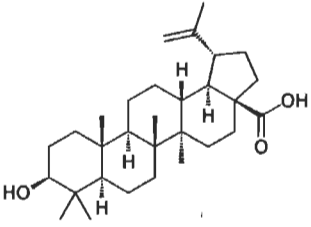
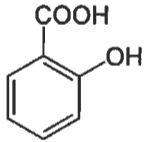
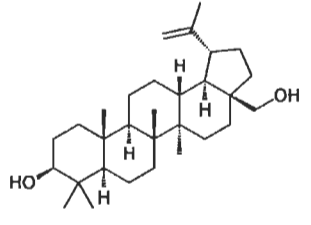
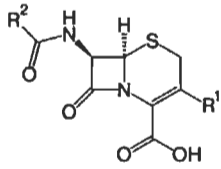
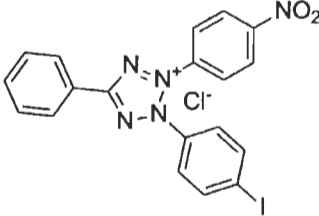
- Radulović, N., Đorđević, N., Denić, M., Pinheiro, M. M. G., Fernandes, P. D., Boylan, F., 2012. A novel toxic alkaloid from poison hemlock (*Conium maculatum* L., Apiaceae): Identification, synthesis and antinociceptive activity. *Food and Chemical Toxicology* 50, 274-279.
- Roberts, M. F., Wink, M., 1998. *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- Royer, M., Ben Amor, A., Boucher, M.-A., 2016. *Les extractibles forestiers*. Biosourcé Volume 3, 18.
- Royer, M., Houde, R., Stevanovic, T., 2010. Volet 1: Les extractibles forestiers québécois. Potentiel de développement lié aux extractibles forestiers: État des connaissances et devue des marchés. Département des sciences du bois et de la forêt, Centre de recherche sur le bois, Université Laval, Québec Wood Export Bureau.
- Royer, M., Houde, R., Viano, Y., Stevanovic, T., 2012. Non-wood forest products based on extractives-a new opportunity for the Canadian forest industry Part 1: Hardwood forest species. *Journal of Food Research* 1, 8.
- Royer, M., Prado, M., García-Pérez, M. E., Diouf, P. N., Stevanovic, T., 2013. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition* 1, 158-167.
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 327-336.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., Jabbar, A., 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* 27, 238-254.
- Santé Canada, 2003. À titre d'information : La résistance aux agents antimicrobiens.
- Santé Canada, 2014. Exigences en matière d'innocuité et d'efficacité relatives aux désinfectants assimilés aux drogues pour surfaces dures.
- Savoia, D., 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future microbiology* 7, 979-990.
- Schultz, T. P., Nicholas, D. D., 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54, 47-52.

- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1202-1205.
- Smith, H. H., 1932. Ethnobotany of the Ojibwe Indians. *Bull. Publ. Museum Milwaukee* 4, 365.
- Smith, J. J., McFeters, G. A., 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods* 29, 161-175.
- Stermitz, F. R., Kamm, C. D., Tawara, J. N., 2000. Piperidine alkaloids of spruce (*Picea*) and fir (*Abies*) species. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 177-181.
- Stevanovic, T., Diouf, P. N., Garcia-Perez, M. E., 2009. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science* 5, 264-295.
- Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., Mousavi, S. H., 2008. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3443-3447.
- Taylor, J., 2001. *Microorganisms and Biotechnology*. Nelson Thornes.
- Tenover, F. C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control* 34, S3-S10.
- Tezel, U., Pavlostathis, S. G., 2015. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 296-304.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2474-2478.
- Uhl, M., Gans, O., Grillitsch, B., Fürhacker, M., Kreuzinger, N., 2005. Grundlagen zur Risikoabschätzung für quaternäre Ammoniumverbindungen. *Umweltbundesamt*.
- Vandal, J., Abou-Zaid, M. M., Ferroni, G., Leduc, L. G., 2015. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada. *Pharmaceutical Biology* 53, 800-806.

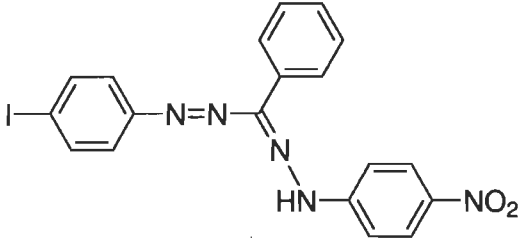
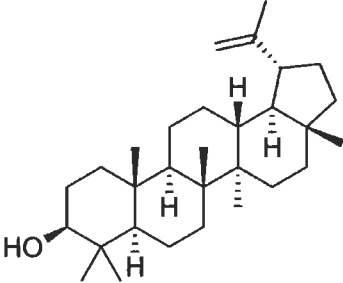
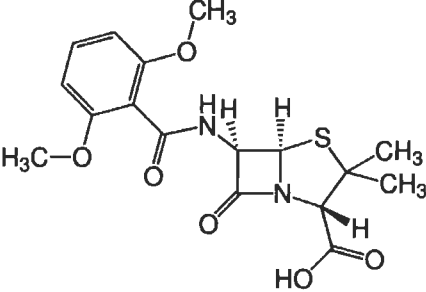
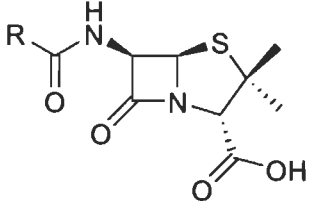
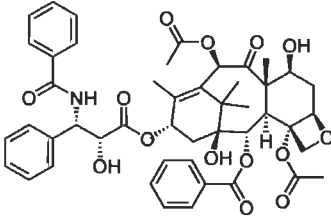
- Vercauteren, J., Chèze, C., 1998. Polyphenols 96: 18th International conference on polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18, 1996. Editions Quae.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., Strynadka, N. C., 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8, 525-533.
- Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Reunanen, M. H., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Eckerman, C. S., Pohjamo, S. P., Holmbom, B. R., 2003. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7600-7606.
- Wink, M., 2008. Ecological roles of alkaloids. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*. Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co, 3-24.
- Wink, M., 2010. *Annual plant reviews, functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. John Wiley & Sons.
- Wink, M., 2011. *Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism*. John Wiley & Sons.
- Wink, M., Van Wyk, B.-E., 2008. *Mind-altering and poisonous plants of the world*. Timber Press Portland.
- Xue, J., Davidson, P. M., Zhong, Q., 2013. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 12720-12726.
- Yu, H.-H., Kim, K.-J., Cha, J.-D., Kim, H.-K., Lee, Y.-E., Choi, N.-Y., You, Y.-O., 2005. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food* 8, 454-461.
- Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 8, 33-42.
- Zhao, G., Yan, W., Cao, D., 2007. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 959-962.

ANNEXE A

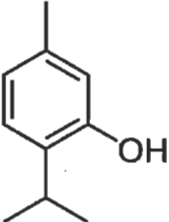
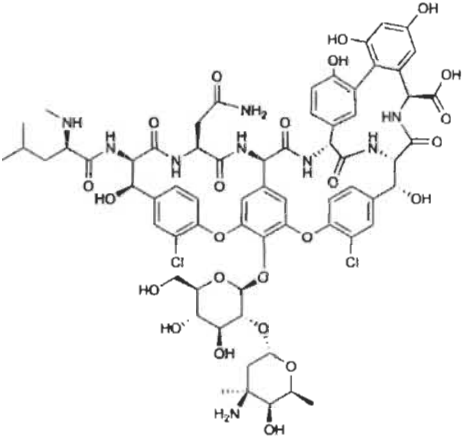
STRUCTURE CHIMIQUE

Numéro	Nom chimique	Structure chimique
1	Acide bétulinique	
2	Acide salicylique	
3	Bétuline	
4	Céphalosporine	 <p style="text-align: center;">Noyau de base</p>
5	Iodonitrotétrazolium (INT)	

Structure chimique (suite)

Numéro	Nom chimique	Structure chimique
6	INT-formazan	
7	Lupéol	
8	Méticilline	
9	Pénicilline	
11	Taxol	

Structure chimique (suite)

Numéro	Nom chimique	Structure chimique
12	Thymol	 <p>The chemical structure of Thymol is a benzene ring with a methyl group at the top position, a hydroxyl group (-OH) at the 3-position, and an isopropyl group at the 4-position.</p>
13	Vancomycine	 <p>The chemical structure of Vancomycin is a complex glycopeptide antibiotic. It features a central bicyclic core consisting of a 6-epi-vanilloyl-L-valine and a 3,5-dihydroxyphenylglycine moiety. This core is linked to a series of amino acid side chains, including L-threonine, L-phenylalanine, L-lysine, and L-valine. The structure also includes a 3,5-dihydroxyphenylglycine moiety with a hydroxyl group at the 4-position. The molecule is highly complex and contains multiple stereocenters.</p>

ANNEXE B

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1.

Crude chemical composition of white birch bark water and methanol extract using UPLC-QTOF-MS in positive and negative ionization mode.

Crude chemical composition of white birch bark water extract using UPLC-QTOF-MS analyses in positive mode.			
Exact mass [M+H]	Retention time (R _t)	Compounds	Area under the curve
282.2869	26.54	9-Octadecenoate	11588.1
214.9984	35.55	2,5-Dioxo-2,5-dihydrofuran-3,4-diyl diacetate	4219.8
254.2584	23.78	(-)-Solenopsin A	3784.6
249.1232	8.40	Arctabsin	3741.6
563.5732	26.58	Oleic acid, eicosyl ester	3658.6
256.2760	26.02	1-Heptadecanamine	3269.5
297.1591	14.44	4-Prenylresveratrol	3203.3
287.1035	9.52	Fisetin	3165.9
165.0511	0.98	L-Rhamnose	2980.3
228.2430	23.05	Myristamide	2545.1
287.1035	15.57	Kaempferol	2413.5
564.3776	8.19	Tris(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny) phosphate	2119.6
184.0484	0.97	3-Carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone	2028.6
520.3510	7.87	Terpendole C	1984.0
142.0390	0.98	Gentianaine	1898.8
608.4124	8.43	C35H61NO7	1869.7
476.3204	7.53	Tubulosine	1715.3
214.9984	36.19	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate	1635.7
107.0503	14.45	D-Glycerate	1521.4
267.1002	10.78	Carbamazepine- <i>o</i> -quinone	1516.1
301.0838	15.92	3-Methoxyapigenin	1507.1
652.4316	8.71	1-Deoxy-1-[dodecanoyl(nonyl)amino]-4-O-hexopyranosylhexitol	1477.7
503.3298	7.89	4a,7b-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1,1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9-decahydro-9aH-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-c]azulen-9a-yl decanoate	1233.0
273.0878	12.22	Arbutin	1224.6
139.9936	34.87	2-Nitrophenol	1145.1
459.3102	7.53	Phthalic acid - (8xi,13xi)-abietan-18-ol (1:1)	1135.6
547.3581	8.16	Trioctyl trimellitate	1128.3
432.3024	7.20	(2beta,3alpha,5alpha,16alpha)-3-Hydroxy-16-methyl-2-(4-morpholinyl)pregnane-11,20-dione	1125.5
154.9842	1.01	3,4-Dihydroxybenzoate	1108.2
268.2797	25.21	9-Octadecen-1-amine	958.8
415.2808	7.18	1-Methyl-3-oxoandro-1-en-17-yl heptanoate	911.1
202.0671	1.00	2'-Aminobiphenyl-2,3-diol	906.2
295.1483	14.30	Phytuberin	867.1
696.4679	8.92	guinetolate	830.5
161.0354	0.99	2-Oxoadipate	769.5
296.2758	20.98	N-Hexadecylacrylamide	768.3
271.1084	13.62	2'-O-Methylisiquiritigenin	755.3
307.1928	11.10	Conferiflorin	745.2
343.1249	10.00	Coniferin	685.6
140.0050	1.02	4-Nitrophenol	672.6
181.0349	34.86	D-Glucose	672.3
149.0252	22.43	trans-Cinnamate	630.2
317.1948	9.21	Pisiferic acid	615.3
124.0296	0.97	Nitrobenzene	580.2
546.2267	12.90	alpha-D-Galactosyl-N-acetyllactosamine	571.1
119.0215	0.97	Succinate	515.7

Table S1. continued

Chemical name (No. H)	Retention time (min)	Compound	Area under the curve
109.9359	5.65	Carbonyl	4972.6
142.1385	5.78	Phenol	4517.2
145.0359	5.85	Phenol	4517.2
245.6922	15.55	Acetic acid	2842.2
271.6004	12.20	Acetic acid	2761.9
449.7304	10.78	Formic acid	2522.9
459.1435	8.90	Formic acid	2522.9
463.1435	8.90	Formic acid	2522.9
163.6480	3.59	Acetic acid	2543.8
571.2244	5.10	2,3-Dihydroxybutanoic acid	2114.3
431.1579	10.37	2,3-Dihydroxybutanoic acid	2089.2
421.1577	9.51	2,3-Dihydroxybutanoic acid	1979.0
421.1577	9.51	2,3-Dihydroxybutanoic acid	1979.0
245.6284	12.41	Acetic acid	1960.6
299.6283	15.93	Formic acid	1760.1
335.1531	4.52	Formic acid	1742.4
337.1433	5.00	Formic acid	1721.9
337.1433	5.00	Formic acid	1721.9
191.6339	1.31	Formic acid	1526.0
297.6274	9.51	2,3-Dihydroxybutanoic acid	1221.8
121.0385	9.42	2,3-Dihydroxybutanoic acid	1116.5
465.1720	9.51	2,3-Dihydroxybutanoic acid	980.7
521.1848	3.51	Acetic acid	976.3
507.2056	4.77	Formic acid	936.3
157.0694	3.92	Formic acid	925.8
285.1237	5.64	Formic acid	869.9
285.1237	5.64	Formic acid	869.9
343.2144	5.85	Formic acid	796.9
171.1150	11.63	Formic acid	786.6
179.6276	1.19	Formic acid	781.7
175.1160	8.45	Formic acid	681.7
267.2112	12.66	Formic acid	601.4
325.1135	6.54	Formic acid	590.0
373.1419	7.96	Formic acid	590.0
441.1657	7.75	Formic acid	548.2
431.2262	5.10	Formic acid	511.8
527.1934	12.89	Formic acid	516.3
381.1462	2.65	Formic acid	515.6
373.1308	16.12	Formic acid	514.6
417.1329	2.45	Formic acid	498.1
117.0289	2.45	Formic acid	486.3
501.2240	8.90	Formic acid	471.9
381.0873	13.14	Formic acid	455.2
193.6641	1.21	Formic acid	455.2
391.1157	14.79	Formic acid	431.3
422.2042	9.99	Formic acid	429.3
485.1848	7.65	Formic acid	426.2
393.1251	13.81	Formic acid	423.3
405.1506	9.90	Formic acid	415.6
425.1842	9.45	Formic acid	409.2
234.0911	11.41	Formic acid	408.8
447.1648	11.41	Formic acid	407.2
373.1308	14.61	Formic acid	381.7
421.3271	34.89	Formic acid	381.2
162.6478	6.16	Formic acid	376.6
509.1733	17.00	Formic acid	361.9
425.1757	7.55	Formic acid	343.9
493.1732	8.21	Formic acid	341.4
447.1648	8.56	Formic acid	338.1
314.1254	3.31	Formic acid	337.9
144.1003	9.92	Formic acid	325.9
295.1783	22.63	Formic acid	320.2
545.1899	11.14	Formic acid	318.2
389.1351	10.65	Formic acid	317.4
153.0333	4.39	Formic acid	300.7
138.0574	5.92	Formic acid	293.0
411.2079	9.51	Formic acid	271.0
391.1730	7.13	Formic acid	260.4
527.1674	12.62	Formic acid	231.1
432.2042	9.46	Formic acid	221.7

Table S1. continued

Crude chemical composition of white birch bark methanol extract using UPLC-QTOF-MS analyses in positive mode.			
Exact mass [M+H]	Retention time (R_t)	Compounds	Area under the curve
140.1349	11.65	Pinidine	5190.3
128.1771	14.57	Coniine	3912.2
150.9699	13.64	Asparagusate	3106.1
377.3593	11.13	C ₂₀ H ₄₀ O ₆	3809.1
326.9941	12.99	Butonate	2951.5
122.8746	9.68	C ₆ H ₂ O ₃	2613.2
342.2122	11.14	Isocorypalmine	3314.2
242.4491	7.37	C ₁₆ H ₄₉	3461.5
216.4768	9.59	C ₆ H ₄₇ O ₆	3991.4
215.0140	5.59	2-Deoxy-D-ribose 1-phosphate	1947.3
276.1790	7.40	Annotinine	1859.3
378.1298	11.15	6-(2-Hydroxyethyl)-5,6-dihydrosanguinarine	1398.2
142.1624	10.76	Methylconiine	1374.2
290.2941	9.26	17a-Aza-D-homoandrost-5-en-3beta-ol	1607.6
342.9818	11.14	Carbophenothion	1200.5
300.0028	9.27	1-Methylseleno-N-acetyl-D-galactosamine	1180.8
285.1934	20.07	Retinal	1112.1
352.8556	9.36	C ₈ O ₁₆	934.7
388.1222	9.42	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₄	823.4
243.1798	7.38	Falcarinone	877.8
217.1958	9.58	12-Hydroxydodecanoic acid	540.8
251.3133	20.06	C ₉ H ₄₆ O ₆	939.2
217.1958	9.87	12-Hydroxydodecanoic acid	523.3
227.9633	8.76	C ₁₃ H ₇ O ₄	709.3
159.0468	1.38	Ibotenic acid	482.2
276.9267	7.37	C ₁₅ O ₆	228.4
285.1934	20.34	(+)-Larreatricin	336.7
251.3133	20.47	C ₁₀ H ₃₄ O ₆	256.4
126.1111	3.31	C ₄ H ₁₃ O ₄	301.0

Table S1. continued

Crude chemical composition of white birch bark methanol extract using UPLC-QTOF-MS analyses in negative mode.			
Exact mass [M-H]	Retention time (R _t)	Compounds	Area under the curve
313.1478	11.61	Perilloside	1893.1
271.0771	12.35	Naringenin, Phloretin, Butcin ou Arbutin	1594.2
295.1493	14.53	Deoxystansioside	1284.1
373.1544	7.44	Hydroxymatairesinol	1249.4
639.2776	11.13	C42H40O6	1161.8
299.1744	14.20	Kaempferid	1138.4
315.1700	10.76	Sesquiterpene	1127.9
285.0872	15.69	Acacetine	1127.7
329.2446	13.64	Dimethylquercetin	1106.8
521.2055	9.73	C33H30O6	1035.3
593.2709	11.13	Apigenin-diglucoside	1013.0
655.2672	8.89	Methyl 3-O-benzyl-4-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-b-D-xylopyranosyl)-b-D-xylopyranoside	997.0
473.1739	9.52	Chicoric acid isomer	957.8
459.1974	7.32	Pentacosyl Resorcinol	949.6
573.1666	12.98	C35H26O8	936.2
287.0742	9.63	Eriodictyol isomer ou Phlorin	844.1
523.2272	9.40	Ligstroside isomer	804.4
523.2272	9.26	Ligstroside	784.8
431.1400	10.32	Apigenin 6-glucoside	746.0
319.0613	7.06	3,4-DHPEA-EDA	692.9
421.1602	9.06	C21H26O9	670.1
423.1767	9.59	C21H28O9	657.4
473.1739	9.16	Chicoric acid	593.8
423.1767	9.86	C21H28O9	579.7
543.1417	12.32	Diferuloylquinic acid	566.9
435.1445	10.83	Phloridzin	492.3
343.1340	7.99	Anhydro-secoisolariciresinol	463.9
327.1602	7.45	C20H24O4	450.5
421.1305	5.64	C27H18O5	443.8
627.3060	11.57	C31H48O13	436.7
331.1245	5.47	Galloyl glucose	411.5
295.1576	16.52	C12H24O8	396.8
507.2391	11.53	C30H36O7	395.0
469.1547	8.55	Valoneic acid dilactone	394.4
314.1710	11.57	C16H27O6	388.8
451.1421	9.65	Hydroxyphloretin-glucoside	382.5
505.2050	7.32	C26H34O10	358.7
297.1543	15.33	C15H22O6	356.2
507.1955	10.03	C32H28O6	351.7
393.1194	13.88	C22H18O7	350.9
287.0824	10.97	Eriodictyol isomer or Phlorin	333.5
423.1866	10.26	C22H32O8	327.0
301.1008	13.30	Hesperetin	305.6
477.1890	10.25	Taramixin	304.2
179.0905	1.55	Caffeic acid	286.2
303.0838	8.48	Taxifolin	279.5
163.0530	7.85	Coumaric acid	267.6
377.1246	14.69	3,4-DHPEA-EA	239.2
296.1717	14.49	C16H25O5	235.7
137.0389	9.89	Hydroxybenzoic acid	228.2
377.1339	16.26	Oleuropein-aglycone	223.1
137.0502	6.05	Hydroxybenzoic acid	194.7
327.1514	9.19	C12H24O10	133.1
393.1385	12.73	C23H22O6	118.5
521.2055	7.51	C33H30O6	104.6