

MCours.com

**CHAPITRE 2**  
**MÉTHODOLOGIE**

## MÉTHODOLOGIE

### 2.1 LA RÉCOLTE ET LA PRÉPARATION

#### 2.1.1 La récolte du matériel végétal

La première partie du matériel végétal a été récoltée le 18 mai 2004 soit *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. resinosa* et *Thuja occidentalis*. Ces espèces ont été prélevées à la station de recherche de Simoncouche, 48°14'38.43"N, 71°15'15.51"O, ainsi qu'au lac des Îlets, 48°12'13.40"N, 71°14'57.99"O. Quatre individus par espèce ont été récoltés afin d'avoir un échantillonnage représentatif et ainsi minimiser l'impact des différences individuelles. Les arbres furent ébranchés, coupés en billots de 1 m et entreposés dans un réfrigérateur à 4°C.

La seconde récolte a eu lieu le 5 mai 2005 pour un criblage biologique plus étendu, en vue de travaux futurs. Huit espèces ont été prélevées : *Thuja occidentalis*, *Pinus banksiana*, *Abies balsamea*, *Populus tremuloïdes*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera*, *Picea mariana*, et *Picea glauca*. Ces échantillons ont été récoltés sur le même site que la première cueillette et transportés à l'UQAC.

#### 2.1.2 La préparation du bois

L'écorçage des billots à l'aide d'une plane a permis d'obtenir le bois. Les billots ont été découpés en tranches minces au moyen d'une scie à ruban. Les tranches de bois furent ensuite placées une journée dans une étuve Theko Model 18, à une température variant entre 40°C et 50°C. Un ciseau à bois a ensuite été utilisé pour réduire les tranches de bois en morceaux afin d'être en mesure d'introduire le bois dans le broyeur.

### 2.1.3 Le broyage

Le broyage des morceaux de bois en fine poudre fut réalisé à l'aide d'un broyeur de marque Fritsch, modèle D-55743. Le tamis utilisé laissait passer des particules d'une grosseur maximale de 2 mm. La poudre végétale ainsi récupérée a été placée dans des sacs de papier. Sur ces sacs sont identifiés le nom de l'espèce, le numéro d'individu (1 à 4) et la date de la récolte. La poudre végétale fut ensuite conservée dans un congélateur à -20°C.

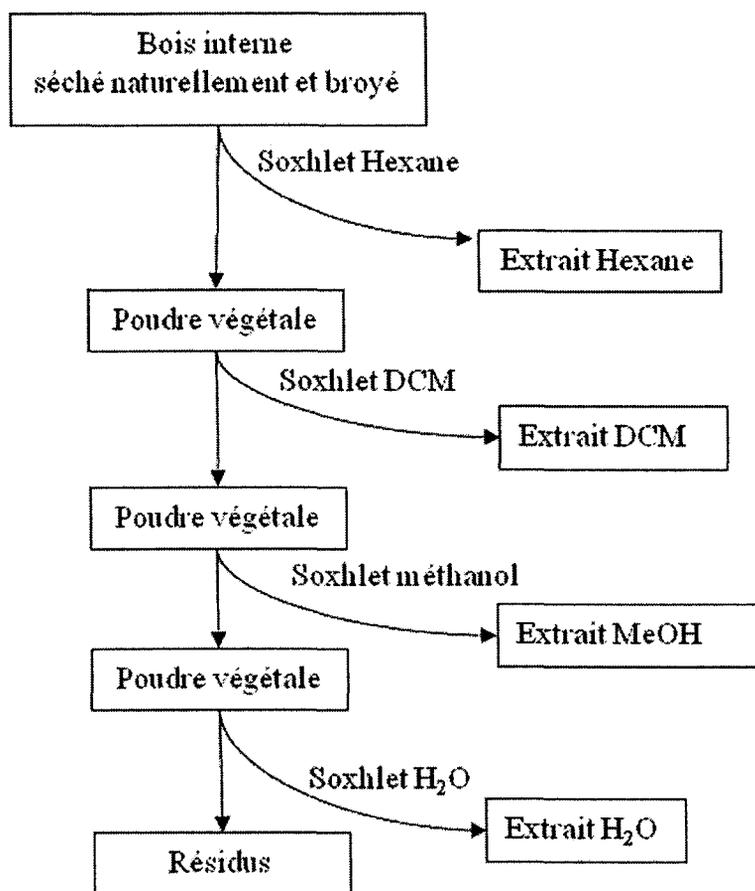
## **2.2 LES EXTRACTIONS DES PRODUITS NATURELS**

Au fil du projet, différents types d'extraction ont été effectués. L'extraction utilisait une quantité égale de poudre végétale pour chaque individu afin de réduire la variation interindividuelle. Les extractions servant au criblage biologique ont été effectuées au Soxhlet avec une cartouche contenant approximativement 50 g de matériel végétal, tel que décrit à la section 2.2.1 ci-dessous. Pour obtenir une quantité suffisante d'extrait, l'extraction du *Pinus banksinana*, espèce choisie pour l'analyse phytochimique, fut accomplie à l'aide d'un Soxhlet de 400 g (section 2.2.2 ci-dessous). Quelques expérimentations ont été effectuées avec une sonde ultrasonique dans le but d'optimiser les rendements d'extraction. Les détails de ces expériences sont décrits à la section 2.2.3 ci-dessous.

### 2.2.1 Extractions au Soxhlet à petite échelle (50 g)

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Les

extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante (figure 7). Les solvants utilisés étaient l'hexane, le dichlorométhane, le méthanol et l'eau. Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale.



**Figure 7 :** Schéma de l'extraction au Soxhlet

Les joints de verre frittés du montage étaient recouverts de ruban de téflon pour empêcher les fuites et diminuer les pertes de solvant. Le montage a été réalisé à l'aide d'un ballon de 250 ml, d'un Soxhlet de 60 mm de diamètre, d'un réfrigérant ainsi que d'une cartouche de cellulose (Whatmann, 60 x 180 mm) contenant la matière végétale broyée.

L'expérience nécessitait 700 ml de solvant. Une petite quantité de pierre ponce servait à régulariser l'ébullition. La mante chauffante était utilisée à une puissance correspondant à 70 % de sa capacité. Après le passage de chaque solvant, la cartouche séchait 24 heures à l'étuve à 40°C. Les extraits étaient ensuite évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait aqueux était, pour sa part, lyophilisé grâce à un appareil de marque Labconco, modèle 6 l.

### 2.2.2 Extractions au Soxhlet à grande échelle (400 g)

Même si le principe reste identique, l'extraction au Soxhlet de 400 g présente plusieurs différences. Premièrement, un système de fixation permanent était nécessaire pour immobiliser le montage. La verrerie requise comprenait un ballon de 4 l, le Soxhlet de 400 g et un réfrigérant de 40 cm. Les joints de verre frittés étaient recouverts de ruban de téflon. Les cartouches utilisées étaient des Whatmann 90mm x 200mm. Trois litres de solvant et des pierres à ébullition étaient nécessaires pour assurer le bon fonctionnement du système de retour du solvant. Le fort volume de solvant et la grosseur du système augmentait considérablement le temps requis pour faire le premier cycle. Des bandelettes isolantes servaient à recouvrir la partie inférieure du Soxhlet. Ces bandelettes assuraient une certaine isolation et contribuaient à diminuer l'emballement de l'ébullition difficile à contrôler avec ce système. La régulation thermique de la mante exigeait beaucoup de précision et d'attention pour maintenir le point d'ébullition, tout en empêchant qu'elle ne s'emballe et provoque des projections.

L'extraction sur de grandes quantités de bois impliquait deux solvants, hexane et dichlorométhane. Pour l'extraction séquentielle cependant, tout le matériel a d'abord été extrait à l'hexane et ensuite au dichlorométhane. Cette procédure a permis de diminuer la quantité de solvant utilisée puisque le changement de solvant s'effectuait tous les trois jours, plutôt que sur une base quotidienne. Le matériel végétal était remplacé tous les jours. Un litre de solvant était ajouté quotidiennement pour compenser les pertes imputables aux fuites du système. Pour extraire les 10 kg de matrice végétale, 22 jours d'extraction à l'hexane et 22 jours d'extraction au dichlorométhane ont été requis. Le solvant était éliminé des extraits par évaporateur rotatif suivi d'un séjour sur la pompe à vide.



**Figure 8** : Montage du Soxhlet de 400 g

### 2.2.3 Extractions effectuées à la sonde ultrason

L'extraction des produits naturels en utilisant les ultrasons a été envisagée afin d'améliorer le rendement et/ou la vitesse de cette étape. Les pulsations émises par la sonde à ultrasons permettent souvent d'obtenir de meilleurs rendements car elles favorisent le bris des parois cellulaires celluloseux. Dans un erlenmeyer de 500 ml, 50 g de bois était mis en contact avec 500 ml d'hexane. La sonde à ultrasons de marque Sonifer, modèle Cell Disruptor 350 W, a été réglée en mode continu et la puissance ajustée à 70 W. La sonde était plongée dans la solution pendant 30 minutes. La solution était ensuite filtrée pour séparer le filtrat de la matière végétale. Celle-ci était séchée et ré-extraite avec dichlorométhane selon le même protocole. Une tentative non séquentielle, avec dichlorométhane seulement, a aussi été testée. Les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide et les masses des extraits déterminées afin d'évaluer les rendements d'extraction.

### **2.3 LE CRIBLAGE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE**

Les solutions mères des extraits et des fractions ont été préparés à une concentration de 80 mg/ml tandis que les molécules pures étaient préparées à 80 mM. Les solvants utilisés pour dissoudre ces échantillons étaient le méthanol et le DMSO. Des séries de dilutions successives avec du milieu de culture ont été préparées pour chaque échantillon (400 à 3.125 µg/ml ou µM) et 100 µL de chacune des concentrations ont été ajoutés aux cellules à tester.

### 2.3.1 Évaluation de l'activité anticancéreuse

Culture des cellules : les lignées cellulaires humaines suivantes ont été utilisées pour cette étude: A549 (cancer du poumon), DLD-1 (adénocarcinome colorectal) et WS1 (fibroblastes de peau normale). Toutes les lignées ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, États-Unis). Les cellules A549, DLD-1 et WS1 ont été cultivées dans du « Minimum Essential Medium with Earle's salt ». Le milieu de culture a été complété avec 10% de sérum fœtal de veau, des solutions de L-glutamine (1X), de vitamines (1X), de pyruvate de sodium (1X), d'acides aminés non-essentiels (1X), de pénicilline (100 UI) et de streptomycine (100 mg / ml). Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>

Test de cytotoxicité : les cellules à croissance exponentielle ont été inoculées avec une densité de  $5 \times 10^3$  cellules par puits de microplaques 96 puits et 100 µL de milieu de culture ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées pendant 16 heures. Cent microlitres d'extrait (ou de composé pur) de concentrations croissantes a été ajoutés (voir ci-haut). La concentration finale de solvant dans le milieu de culture a été maintenue en deçà de 0,5% (v/v) afin d'éviter leur toxicité des solvants. Les cellules ont été incubées pendant 48 h, en l'absence ou en présence de l'extrait. La cytotoxicité a été évaluée en utilisant le test de Hoechst qui quantifie la quantité d'ADN cellulaire. La fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 350 nm et à une longueur d'onde d'émission de 461 nm. La cytotoxicité est exprimée comme la concentration de l'extrait ou composés inhibant la

croissance des cellules de 50% (IC<sub>50</sub>). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Sylvestre M., 2006]

### 2.3.2 Évaluation de l'activité antibiotique

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode décrite par [Banfi, 2006] avec quelques modifications. Brièvement, les bactéries à croissance exponentielle ont été inoculés dans des plaques 96 puits à fond rond. Les cellules ont été placées dans chaque puits des microplaques à une densité de  $5 \times 10^3$  pour les *E. Coli* (gram-négatives, ATCC 25922) et à  $25 \times 10^3$  pour les *S. aureus* (gram-positive, ATCC 25923) et 50 µl de bouillon nutritif (Difco) ont été ajoutés. Cent microlitres des produits à tester (concentrations croissantes) ont ensuite été ajoutés dans chaque puits en augmentant la concentration des extraits. Cinquante microlitres de résazurine 4% ont été ajoutés à chaque puits et les bactéries ont été incubées pendant 6 h à 37 ° C. La fluorescence a été mesurée après 6 h par un appareil automatisé pour la lecture de plaques 96 puits Fluoroskan Ascent à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm. L'activité antibiotique est exprimée comme la concentration de produit inhibant la croissance des cellules de 50% (IC<sub>50</sub>). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Pichette A., 2007]

### 2.3.3 Évaluation de l'activité antifongique

La levure utilisée pour le test d'activité antifongique était *Candida albicans*. Cette levure a un cycle de division de 3 heures. Comme pour les tests d'activité anticancéreuse, des plaques 96 puits ont étéensemencés et incubées jusqu'à confluence. Les produits à tester

ont déposés dans chaque puit de la même manière que pour les tests d'activité anticancéreuse

#### 2.3.4 Évaluation de l'activité antioxydante

La procédure a été modifiée à partir de la méthode décrite par [Ou, 2001]. Le test ORAC a été effectué sur un Fluoroskan Ascent. Le trolox a été utilisé comme standard de contrôle. L'expérience a été menée à 37,5 °C et à un pH de 7,4, avec un échantillon témoin en parallèle. Le fluorimètre a été programmé pour enregistrer la fluorescence de la fluorescéine toutes les 30 s après l'addition du 2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate (AAPH). Les résultats finaux sont calculés en comparant la différence de l'aire sous la courbe de l'échantillon et celle du témoin. Les valeurs du test ORAC sont exprimées en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme (TE  $\mu\text{mol} / \text{mg}$ ). Les manipulations sont similaires à celle rapportée dans la littérature par notre groupe [Mamelona M., 2007]

### 2.4 LA CHROMATOGRAPHIE

Plusieurs types de chromatographie ont été utilisés dans ce projet. La combinaison de diverses techniques de chromatographie permet d'obtenir des fractions purifiées et, ultimement, des molécules pures.

#### 2.4.1 La nomenclature des échantillons

Les échantillons de ce projet ont tous un code unique qui permet de bien les identifier et de faciliter le retraçage. Le nom des échantillons commence toujours par les initiales de

l'expérimentateur suivi d'un chiffre (1 pour extrait DCM et 6 pour extrait hexane). Les lettres qui suivent correspondent au fractionnement dans l'ordre d'élution. Le nombre de lettres dépend du niveau de complexité de la fraction. Exemple : CS6CD : Il s'agit d'une fraction issue de l'extrait hexane (6) séparé 2 fois. La première lettre (C) indique qu'il s'agit de la troisième fraction et la seconde lettre indique que la fraction C a été refractionnée et qu'il s'agit de la quatrième fraction (D).

#### 2.4.2 La chromatographie sur couche mince

Les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) de marque Silicycle sont recouvertes avec du gel de silice 60 et un indicateur fluorescent à 254 nm. Le milieu d'élution (chloroforme : méthanol, 50 : 1) (Wagner, 1984) était préparé puis ajouté dans la chambre et laissé une heure avant d'y faire migrer les plaques. Le milieu d'élution changeait selon les produits à analyser. Plus les produits étaient polaires, plus l'éluant était riche en méthanol. À l'aide d'une seringue, des dépôts de 15 µl d'une solution de 10mg/ml de l'extrait ou la fraction étaient effectués de façon linéaire sur la plaque. Les différents dépôts étaient espacés de 1 cm afin de prévenir la superposition des taches. Les plaques éluaient sur 7,5 cm lors des chromatographies sur colonne. Pour l'évaluation de la pureté des fractions, les plaques éluaient sur 15 cm pour obtenir une plus grande résolution.

Après migration, la plaque était séchée à l'air puis observée à l'aide d'une lampe UV à deux longueurs d'onde (254 nm et 366 nm). Les taches apparentes ont été notées au crayon plomb pour chaque longueur d'onde. La plaque était ensuite soumise à une pulvérisation d'une solution 1% de vanilline dans EtOH et une pulvérisation subséquente d'une solution

5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans EtOH. Les produits étaient ensuite révélés par chauffage de la plaque à 110°C dans une étuve.

### 2.4.3 La chromatographie sur colonne

#### A) Chromatographie de l'extrait dichlorométhane brut du bois de pin gris

Dans une colonne de 5,8 cm x 50 cm était ajouté un morceau de laine de verre qui empêchait le gel de silice de s'échapper par la valve. 400 g de gel de silice en suspension dans le chloroforme ont été utilisés pour le montage de la colonne. L'extrait (10 g) a été dissout dans 20 ml de chloroforme et le tout a été ajouté délicatement au sommet de la colonne. Le tableau 2 résume les volumes, la composition de l'éluant et le numéro de fraction des solvants utilisés pour effectuer la chromatographie.

**Tableau 2 : Chromatographie de l'extrait dichlorométhane brut**

Volume (ml)	Solvant CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Volume Fraction	Numéro de fraction
1500	100 : 0	25 ml	1 - 60
6000	60 : 1	25 ml	60 - 300
1000	20 : 1	1000 ml	Flush 20 : 1
1000	0 : 100	1000 ml	Flush MeOH

Cette étape a été effectuée à deux reprises pour purifier les 18 g d'extrait dichlorométhane disponibles. Les fractions contenant des produits similaires par chromatographie sur couche mince ont été regroupées.

### B) Chromatographie de l'extrait hexane du bois de pin gris

L'extrait à l'hexane a été partitionné par extraction liquide-liquide entre l'hexane et le méthanol aqueux (60 %). Cette partition avait pour but d'éliminer les acides résiniques présents en grande quantité dans l'extrait brut. La colonne a été montée comme précédemment avec 400 g de silice. La portion soluble dans le méthanol aqueux (6,5 g) a été déposée sur la tête d'une colonne de silice tel que décrit précédemment (9 cm x 14 cm). Le tableau 3 résume les volumes, la composition de l'éluant solvants utilisés pour effectuer la chromatographie et le numéro des fractions associées.

**Tableau 3** : Chromatographie de l'extrait hexane du bois de pin gris

<b>Volume (ml)</b>	<b>Solvant DCM-MeOH</b>	<b>Volume Fraction</b>	<b>Numéro de fraction</b>
2000	100 : 0	230 ml	1 - 9
2000	100 : 1	230 ml	10 - 18
2000	80 : 1	230 ml	19- 27
2000	40 : 1	230 ml	27 - 36
1000	20 : 1	230 ml	37 - 41
1000	0 : 100	1000 ml	Flush MeOH

#### 2.4.4 La chromatographie en phase gazeuse

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé dans ces travaux est celui des laboratoires d'enseignement du Département des Sciences Fondamentales (DSF). Il s'agit d'un appareil Agilent 6890N, couplé à un spectromètre de masse et d'un injecteur automatique de la série 7683. La méthode de chauffage, le débit des gaz ainsi que les différents paramètres sont

résumés au tableau 4. Les échantillons ont été dérivés à l'aide de diazométhane avant l'injection pour augmenter la volatilité des produits (acides).

**Tableau 4** : Paramètre d'utilisation du GC/MS

<b>Appareil:</b> Modèle HP6890	<b>Détection:</b> MS quadrupole Ionisation : EI, 70 eV	<b>Colonne:</b> DB-5 Longueur: 30 m Diamètre: 0.25mm Size : 0.25µm
<b>Conditions chromatographiques :</b> Injection : 3µl Gaz porteur : Hélium, 1ml/min	<b>Température :</b> Injecteur : 250 °C Détecteur : 280 °C Colonne initiale : 100 °C (1 min) Colonne gradient : 3 °C/min Colonne finale : 280 °C	

#### 2.4.5 La chromatographie liquide haute performance

Les travaux d'isolation ont nécessité deux types de chromatographes liquides haute performance (HPLC). Les sous-sections suivantes traitent plus précisément du HPLC analytique couplé à un détecteur MS ainsi que du HPLC à capacité semi-préparative.

##### A) HPLC analytique couplé à un détecteur MS

Le HPLC utilisé est un Agilent de la série 1100 équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un système d'injecteur automatique, d'un module chauffe-colonne, d'un détecteur UV-visible à barrette à diodes ainsi que d'un détecteur MS. Cet appareil permet d'évaluer la complexité d'une fraction, le niveau de pureté d'un produit, et donne également des informations structurales sur les produits séparés (profil de fragmentation et ion moléculaire). De plus, l'appareil a été utilisé pour élaborer une méthode de séparation sur HPLC préparatif.

**Tableau 5 :** Condition en HPLC analytique utilisé pour l'analyse de l'échantillon 1C

<b>Appareil:</b> Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : 1C Fichier : \Sirois\1C000008		<b>Détection:</b> UV (DAD) MSD	<b>Colonne:</b> ZORBAX ODS Longueur: 150mm Diamètre: 4.6mm Size : 5µm # série : USG0014484
<b>Conditions chromatographiques :</b> Injection : 5µl Solvent A : H2O Solvent B : MeOH Élution: Isocratique 50% B Débit: 1mL/min Temp.colonn 25°C			
<b>DAD:</b> Long. d'onde 250	Bandwith 100	<b>Référence :</b> Long. d'onde 360	Bandwith 100
<b>Paramètre MSD :</b>	Mode: scan Polarité: (+)	Mass Range: 100-1000 Fragmentor: 70	
<b>Chambre :</b> Drying gas flow (L/min): 10 Nebulizer pressure (psig): 40 Drying gas temp (°C): 350		Capillary voltage (V): 4000 Corona current (µA): 4 Vaporizer temp (°C): 400	

**Tableau 6 :** Condition en HPLC analytique utilisé pour l'analyse de l'échantillon CS6C

<b>Appareil:</b> Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : CS6C Fichier : \CSirois\66-C0009		<b>Détection:</b> UV (DAD) MSD	<b>Colonne:</b> ZORBAX ODS Longueur: 150mm Diamètre: 4.6mm Size : 5µm # série : USG0014484
<b>Conditions chromatographiques :</b> Injection : 5µl Solvent A : H2O+0.1%HCOOH Solvent B : ACN+0.1%HCOOH Élution : Isocratique 40% B Débit : 1mL/min Temp.colonne : 25°C			
<b>DAD:</b> Long. d'onde 250	Bandwith 100	<b>Référence :</b> Long. d'onde 360	Bandwith 100
<b>Paramètre MSD :</b>	Mode: scan Polarité: (+)	Mass Range: 100-1000 Fragmentor: 70	
<b>Chambre :</b> Drying gas flow (L/min): 10 Nebulizer pressure (psig): 30 Drying gas temp (°C): 350		Capillary voltage (V): 4000 Corona current (µA): 4 Vaporizer temp (°C): 400	

Toutes les fractions furent analysées avec une méthode isocratique. Les tableaux 5 et 6 résument les principaux paramètres de la méthode d'analyse.

### B) HPLC à capacité semi-préparative

Ce type de HPLC permet la récupération du matériel après analyse. Le système semi-préparatif du laboratoire est un appareil Agilent de la série 1100. Il est pourvu de deux pompes binaires, d'un détecteur UV-visible et d'un collecteur de fractions. Les conditions de la fraction 1C apparaissent au tableau 7. La fraction 1E a été traitée dans les mêmes conditions. Cependant, le pourcentage de méthanol y a été ajusté à 40%. La fraction CS6C est soumise aux mêmes conditions d'élution décrites au tableau 6.

**Tableau 7 :** Conditions HPLC utilisées pour l'isolation des composés de la fraction 1C

<b>Appareil:</b> Modèle : Agilent 1100 series Échantillon : 1C Concentration échantillon 100 mg/mL		<b>Détection:</b> UV (DAD)	<b>Colonne:</b> ZORBAX ODS Longueur: 25 cm Diamètre: 21.2 mm Size : 7 µm # série : USBY002127	
<b>Conditions chromatographiques :</b>				
Injection : 200 µL		Élution : Isocratique 50% B		
Solvent A : H <sub>2</sub> O		Débit : 16 mL/min		
Solvent B : MeOH		Temp.colonne : 25°C		
<b>DAD:</b> Long. d'onde	Bandwith	<b>Référence :</b> Long. d'onde	Bandwith	
250	100	360	100	

## 2.5 LA SPECTROSCOPIE

Les techniques spectroscopiques sont généralement des méthodes servant à identifier les produits analysés.

### 2.5.1 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN) Bruker Avance 400 est employé à 298°K pour réaliser les spectres. La sonde QNP (5mm), capable de produire des gradients (Z) de champ magnétique est optimisée pour une fréquence de 400.13 MHz pour le proton et 100.61 MHz pour le carbone. Toutes les molécules font l'objet de plusieurs expériences : 1D  $^1\text{H}$ , 1D  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, COSY, HMBC et HSQC. Les échantillons de 5 à 10 mg sont solubilisés dans le méthanol- $\text{d}_4$  ou le chloroforme-d, selon leurs affinités. Les déplacements chimiques (ppm) ont été référencés avec les signaux du solvant résiduel, pour le chloroforme (proton 7,26 ppm, carbone 77,0 ppm) et pour le méthanol (proton 3,31 ppm et carbone 49,0 ppm).