

# Les plantes au service de notre santé

Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO  
Equipe CSN – ICMR UMR 7312

Winter School « Bioéconomie & Santé »

24 mars 2022

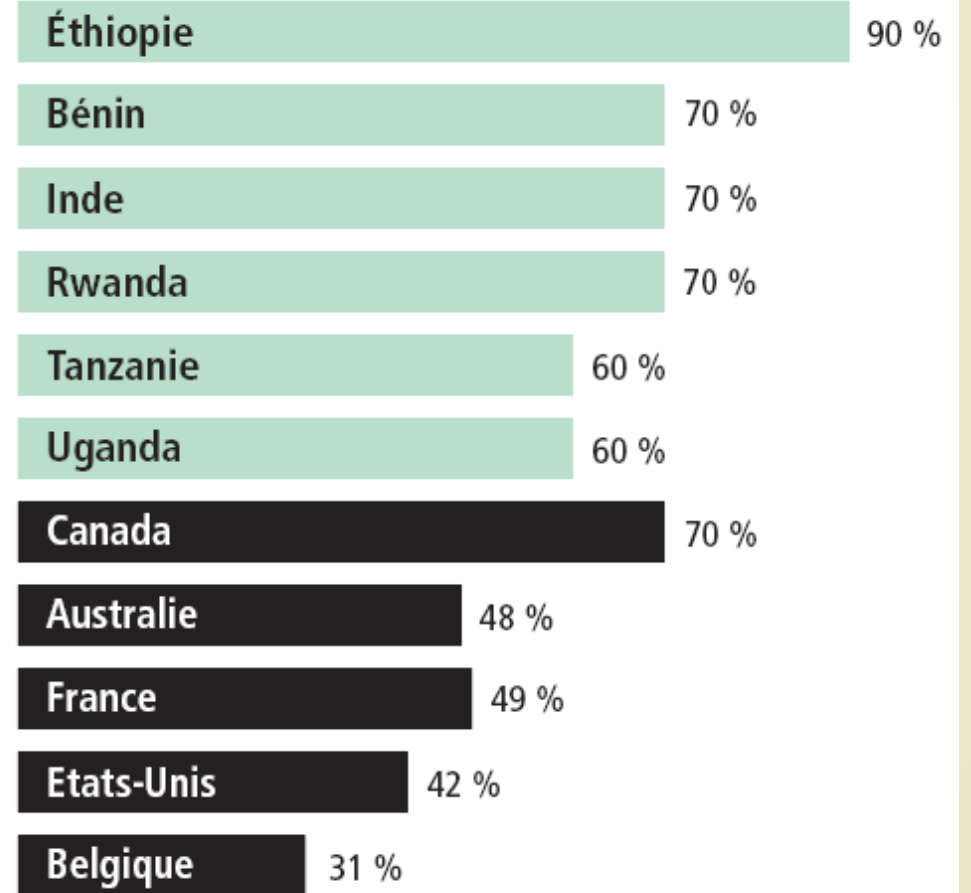
## Homme et plantes médicinales

- OMS : 80% de la population mondiale a recours aux plantes pour se soigner
- Plantes à l'origine de la plupart des principes actifs



Populations utilisant la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaires

Populations des pays développés ayant utilisé la médecine complémentaire et parallèle au moins une fois



Sources: Eisenberg DM et al, 1998; Fisher P & Ward A, 1994; Health Canada, 2001; Organisation mondiale de la Santé, 1999; et rapports de gouvernements soumis à l'OMS.



# Valorisation de la flore champardennaise dans le domaine du vieillissement cutané

Thèse Marie Schmitt



- Inscription dans une **stratégie de recherche** régionale et universitaire à l'interface entre **Bioéconomie et Santé**
- Projet d'innovation stratégique « Bien vieillir en Champagne-Ardenne » de la « S3 » de Champagne-Ardenne et « SkinAgeing » du CPER
- **Sélections de 9 espèces** poussant naturellement dans la région Grand Est (Thèse CHAVIC)
  - Trouver de nouveaux composés actifs



Coronille des jardins  
(Fabaceae)



Baguenaudier  
(Fabaceae)



Lotier-pois  
(Fabaceae)



Aigremoine  
(Rosaceae)

Linaire commune  
(Scrophulariaceae)



Benoîte commune  
(Rosaceae)



Brunelle commune  
(Lamiaceae)



Mélampyre des forêts  
(Orobanchaceae)



Prêle des champs  
(Equisetaceae)

## Le vieillissement cutané

« Préoccupation omniprésente dans le monde actuel touchant tout type d'individu »

Dégradation des fibres élastiques du derme par les élastases = remodelage matriciel

Excès de molécules pro-oxydantes = stress oxydant

Dérèglement de la production de mélanine par la tyrosinase = Hyperpigmentation



Le système immunitaire neutralise ces dommages **mais** son efficacité décline avec l'âge

Solutions naturelles

Mode de vie sain  
Soins cutanés quotidiens  
Alimentation riche en nutriments

Solutions apportées en dermocosmétique avec apports

Antioxydants exogènes  
Composés modulant le remodelage matriciel  
Composés modulant la mélanogénèse

→ Crème solaire  
Crème antirides  
Crème dépigmentante

7

# Méthodologie

→ Couverture d'un large espace chimique

Evaluation des activités  
antioxydantes,  
anti-tyrosinase et  
anti-élastase



Tests biologiques

Déréplication par RMN <sup>13</sup>C  
Identifier les molécules  
nouvelles  
Gain de temps et ciblage  
des molécules d'intérêt



Tests biologiques

Purification des composés des fractions  
ayant les meilleures activités

Tests biologiques

Extrait

- Extrait MeOH/H<sub>2</sub>O
- Extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, n-BuOH

Fractions

- Chromatographie de Partage Centrifuge
- Profilage chimique par RMN<sup>13</sup>C

Composés  
purs

- Purification par HPLC
- Elucidation structurale

Composés actifs  
valorisable



# Criblage chimique et biologique des extraits bruts

Activité antioxydante : tests DPPH,  $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CUPRAC  
 Activité anti-tyrosinase : dosage *in vitro* de la tyrosinase de champignons  
 Activité anti-élastase : dosage *in vitro* de l'élastase de leucocytes humains



Coll. L. Duca et  
N. Etique



*Colutea arborescens*  
Baguenaudier



*Hippocrepis emerus*  
Coronille des jardins



*Lotus maritimus*  
Lotier-pois



*Geum urbanum*  
Benoîte commune

Extraits AcOEt et *n*-BuOH

Extrait AcOEt

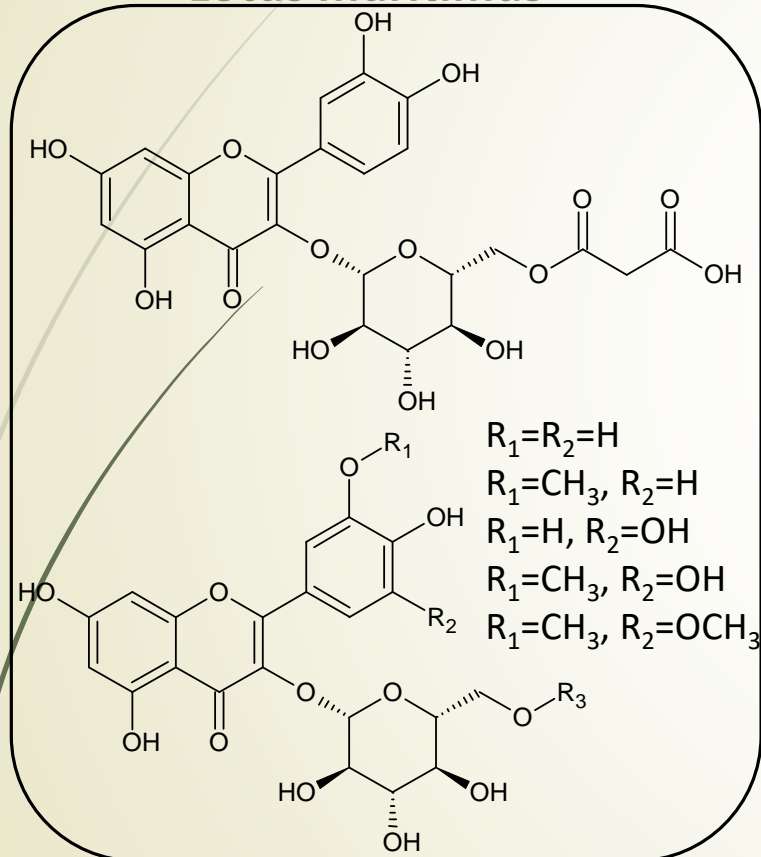
# Activité antioxidante des Fabaceae

Flavonoïdes : potentielle valorisation contre le stress oxydant



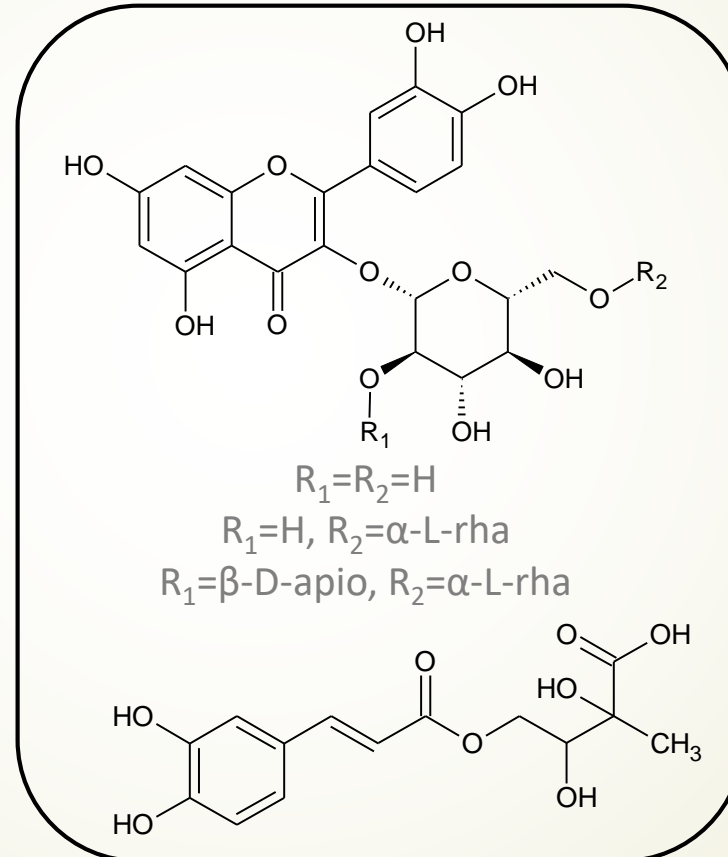
Extraits AcOEt et *n*-BuOH

## *Lotus maritimus*



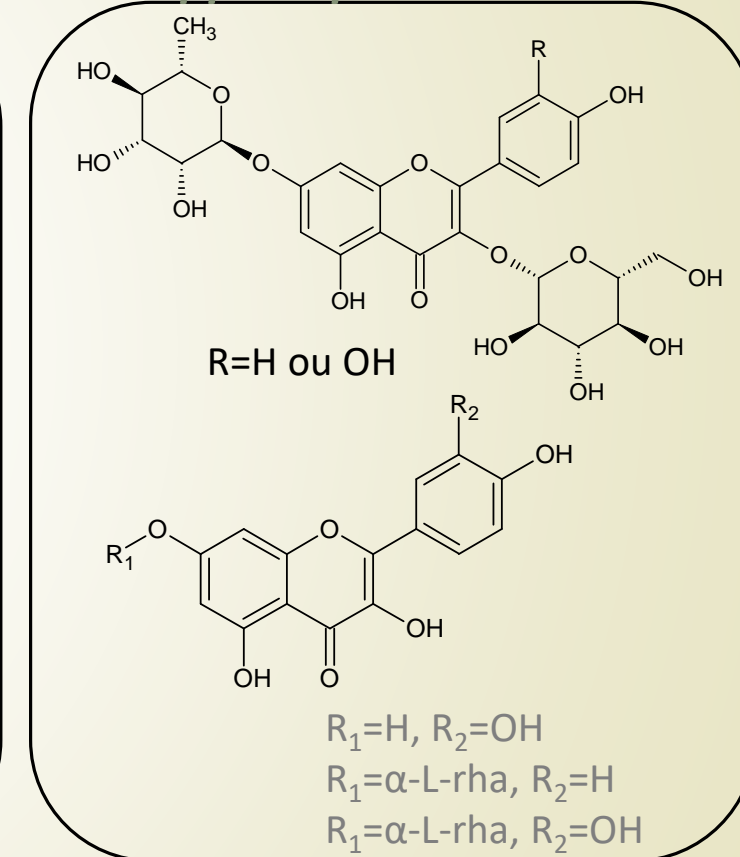
Test DPPH :  $59 < IC_{50} < 318 \mu M$   
 Test  $OH^\circ$  : pas actif  
 Test CUPRAC :  $37 < IC_{50} < 257 \mu M$

## *Colutea arborescens*



Test DPPH :  $11 < IC_{50} < 103 \mu M$   
 Test  $OH^\circ$  :  $26 < IC_{50} < 752 \mu M$   
 Test CUPRAC :  $14 < IC_{50} < 54 \mu M$

## *Hippocrepis emerus*



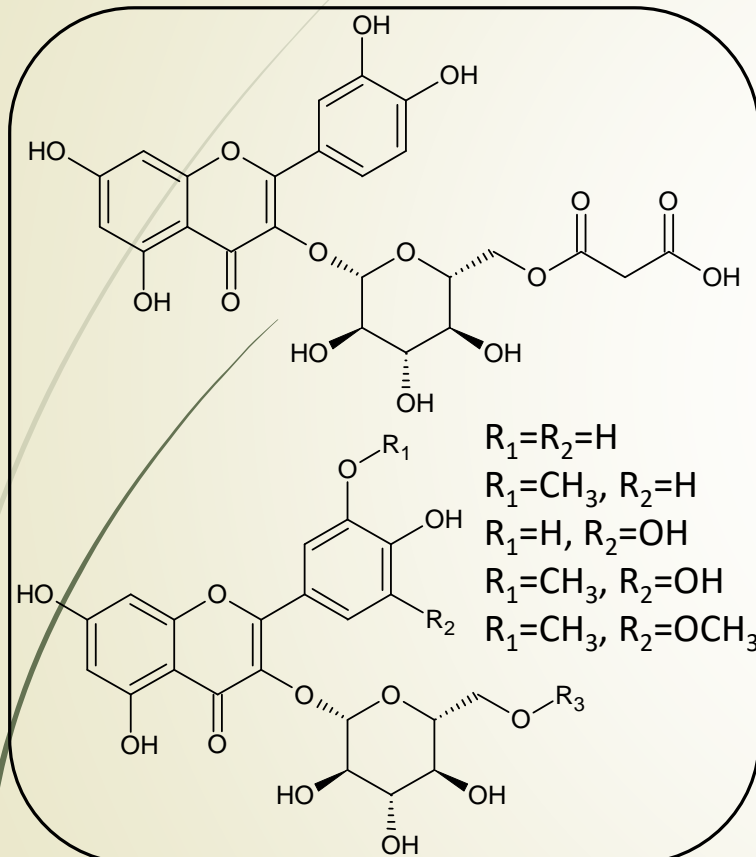
Test DPPH :  $17 < IC_{50} < 219 \mu M$   
 Test  $OH^\circ$  :  $31 < IC_{50} < 888 \mu M$   
 Test CUPRAC :  $12 < IC_{50} < 617 \mu M$

# Autres activités des Fabaceae



Extraits AcOEt et *n*-BuOH

## *Lotus maritimus*

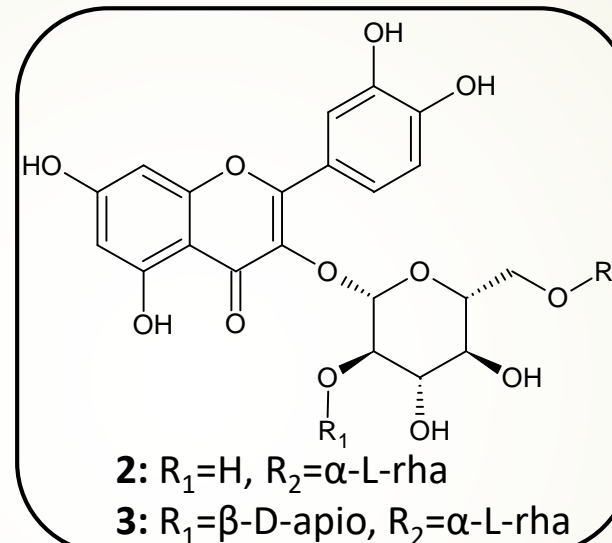


Activité anti-élastase modérée

$$106 < IC_{50} < 135 \mu M$$

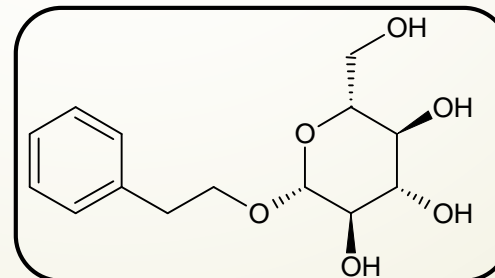
M. Schmitt et al., The Natural Products Journal, 2021

## *Colutea arborescens*



Activité anti-élastase

$$2 IC_{50} = 86 \mu M / 3 IC_{50} = 101 \mu M$$

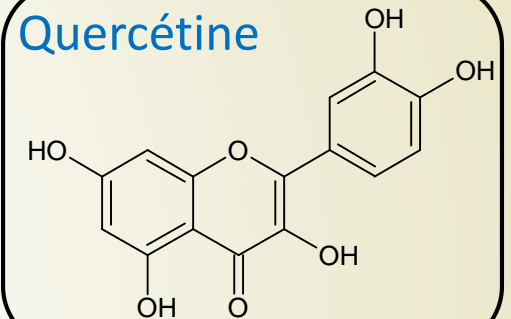


Activité anti-tyrosinase

$$IC_{50} = 63 \mu M$$

## *Hippocrepis emerus*

### Quercétine



Activité anti-tyrosinase

$$IC_{50} = 50 \mu M$$

et anti-élastase

$$IC_{50} = 20 \mu M$$

M. Schmitt et al.,  
Phytochemistry Letters,  
2019, 35 : 28-36.

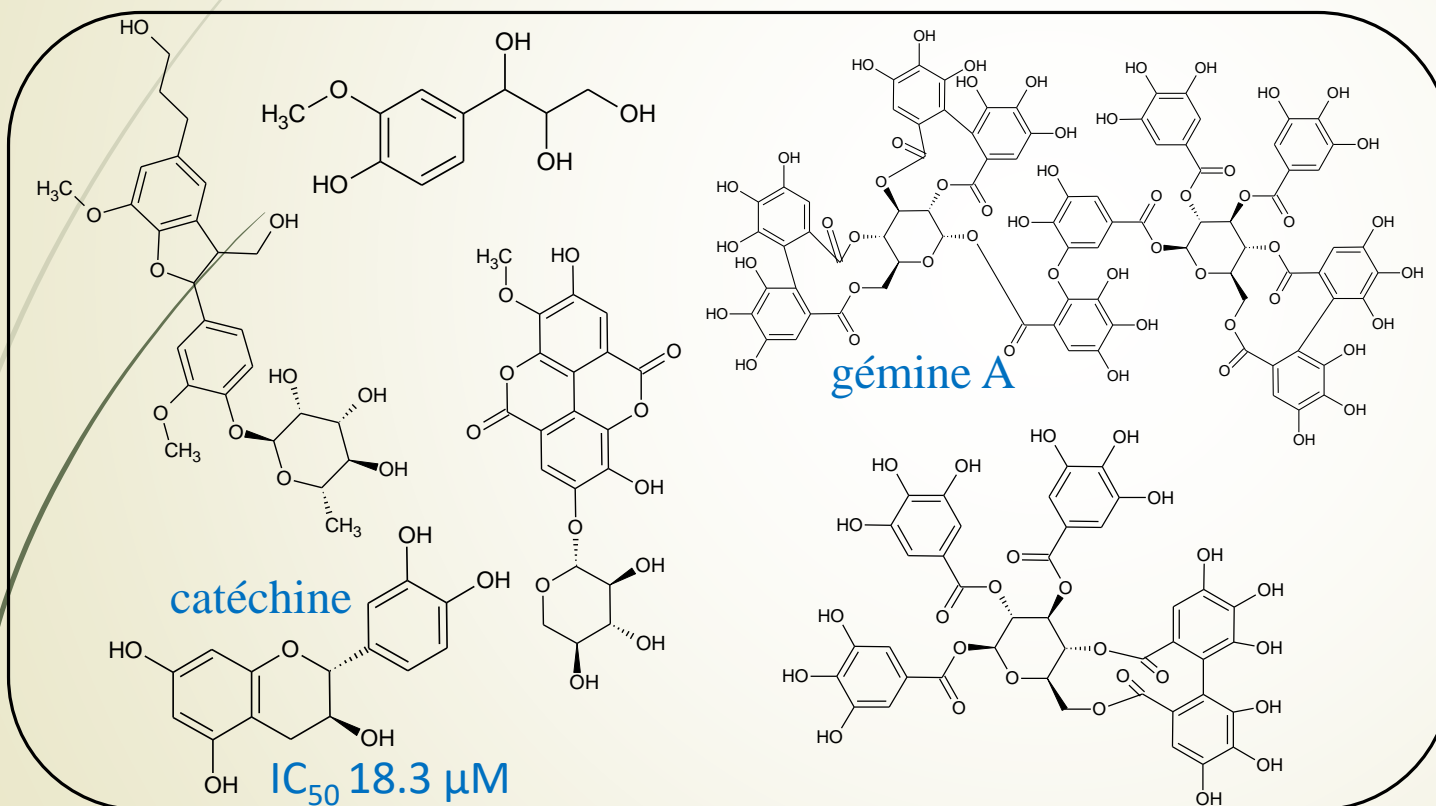
M. Schmitt et al. Currents  
Topics in Phytochemistry  
2020,16:91-103



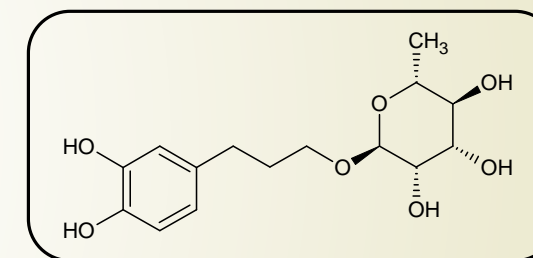
# *Geum urbanum* (Rosaceae)



- 19 composés identifiés des fleurs : tannins ellagiques, galliques, acides phénoliques
- 1 nouveau phénol glycoside



**Extrait AcOEt**  
Activité antioxydante et anti-élastase



**Activité anti-élastase  
modérée des fractions**  
77 % d'inhibition à 31  $\mu$ g/ml

**Activité antioxydante**  
2,7 <  $IC_{50}$  test DPPH < 23  $\mu$ M

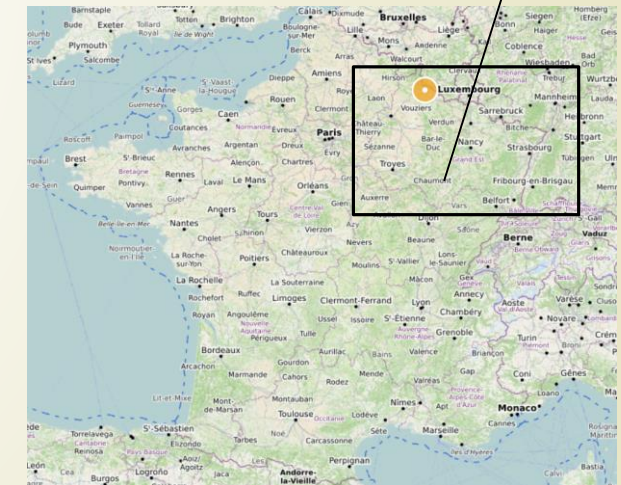
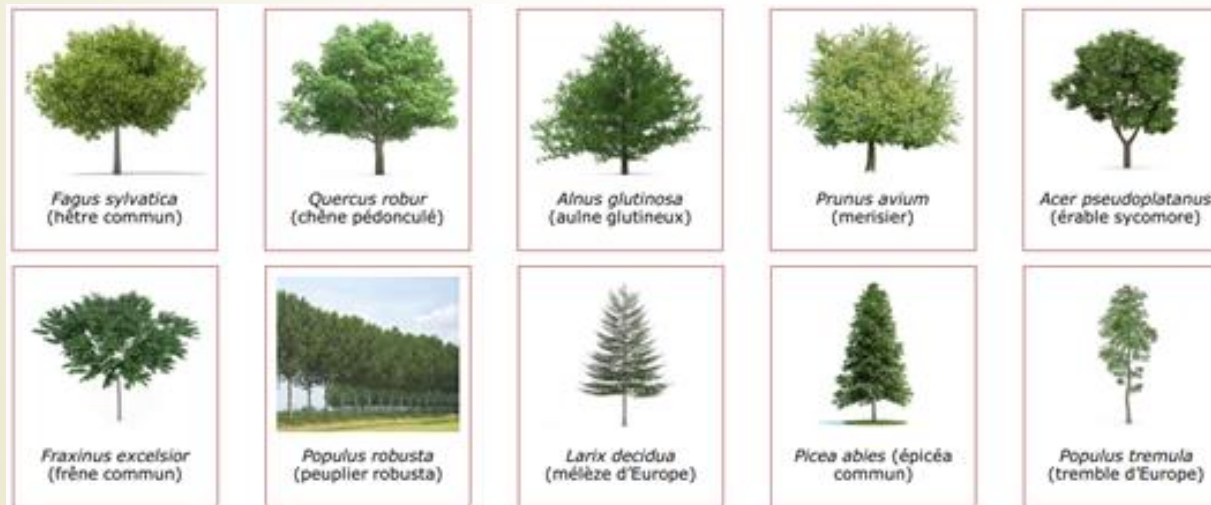
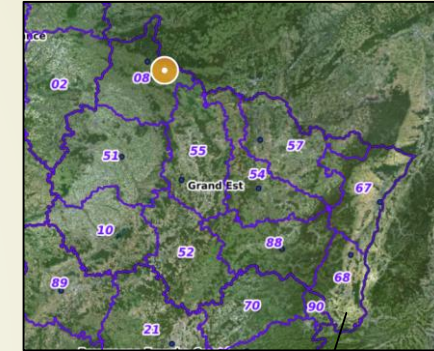
M. Schmitt et al., *Natural Product Communications* 2020,15(3):1-9.

# Valorisation des écorces



Thèse Pierre DARME

- Valorisation des **co-produits** de la filière bois (écorce, brindilles, branches)
  - Un déchet à fort tonnage issu de la filière sylvicole ;
  - Souvent laissé sur place ou brûlé ;
  - Parfois valorisé énergétiquement (biocarburants).
- Découverte de nouvelles **molécules antimicrobiennes**
- Ecorces de **10 espèces** d'arbres provenant de forêts ardennaises

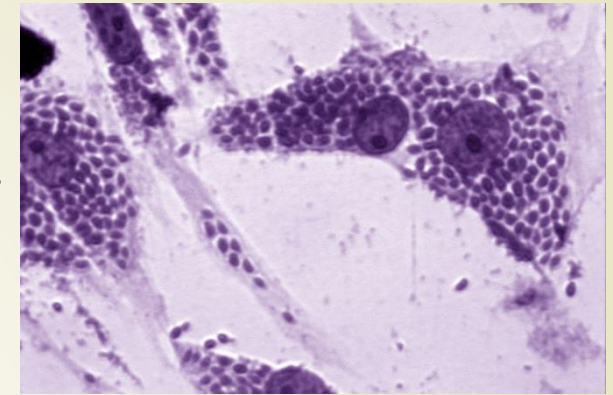




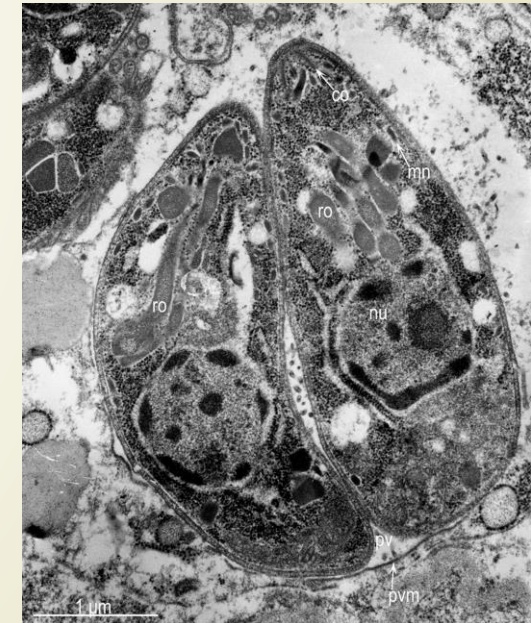
# La toxoplasmose

ESCAPE

Coll. I. Villena, D. Aubert, S. Escott)



- ▶ La seule espèce connue est *Toxoplasma gondii* ;
- ▶ Zoonose ;
- ▶ Habituellement bénigne, peut présenter des risques graves chez le fœtus et l'immunodéprimé (chimiothérapie, SIDA, etc.) :
  - ▶ 600 000 à 700 000 nouvelles infections par ans en France :
    - ▶ 2700 chez les femmes enceintes ;
    - ▶ 300 cas de toxoplasmose congénitale notifiés.
- ▶ Traitements :
  - ▶ Pyriméthamine + sulfamide ;
  - ▶ Très anciens, mal tolérés
  - ▶ Existence de chimiorésistances



Nécessité d'identifier de nouvelles molécules actives



7

# Méthodologie

Extraction séquentielle  
Sélection de l'extrait le plus actif par  
**chimiosensibilité à 100 µg/mL**

Tests biologiques

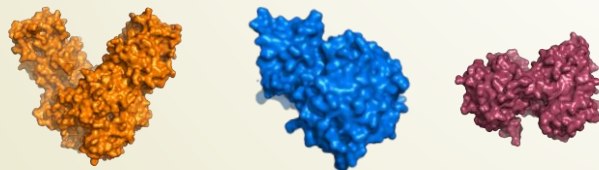
Sélection des fractions les plus actives  
par **chimiosensibilité à 25 µg/mL**

Tests biologiques

**Chimiosensibilité à 10 µM**

Détermination des valeurs de  $CC_{50}$ ,  $CI_{50}$  et calcul de l'IS

Docking inverse sur un ensemble de cibles



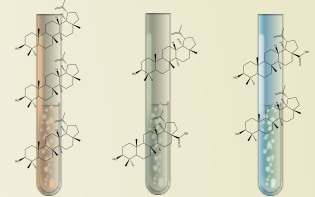
Extrait

- Extraits *n*-heptane, MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>



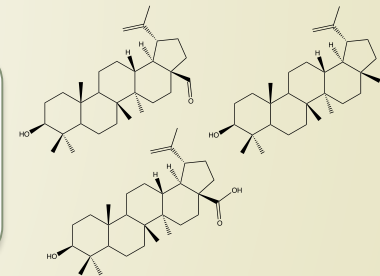
Fractions

- Chromatographie de Partage Centrifuge
- Profilage chimique



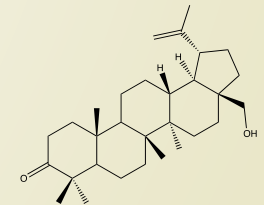
Composés purs

- Purification par HPLC
- Elucidation structurale
- Choix du meilleur candidat

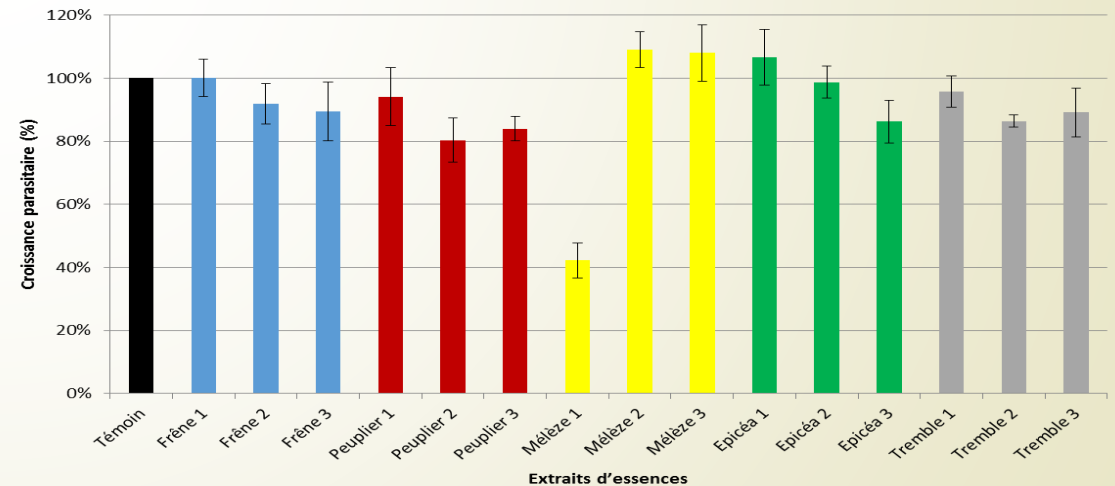
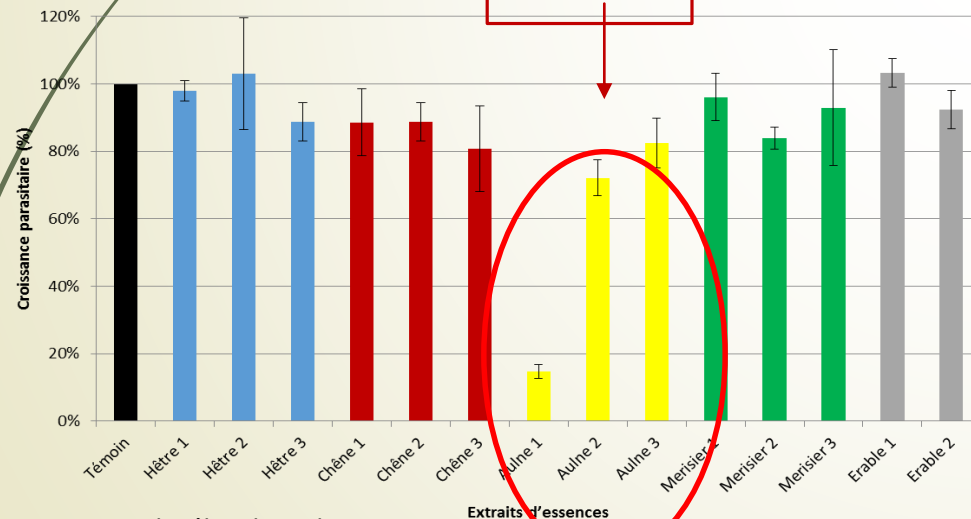


Cible(s) ?

- Identification des cibles potentielles des candidats retenus



- Screening des écorces à 100 µg/mL sur *Toxoplasma gondii* (tachyzoïte)
- l'extrait au *n*-heptane de l'écorce **d'aulne glutineux** présente **82% d'inhibition de la croissance parasitaire**



1 : extrait *n*-heptane  
 2 : extrait MeOH  
 3 : extrait MeOH/H<sub>2</sub>O

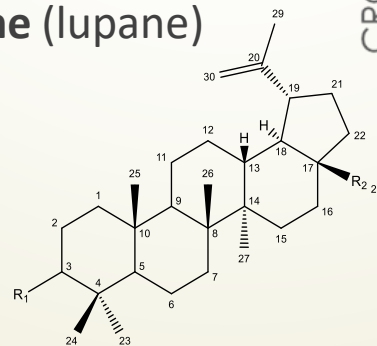
# Chimiosensibilité des fractions sur *T. gondii*

Thèse Pierre DARME

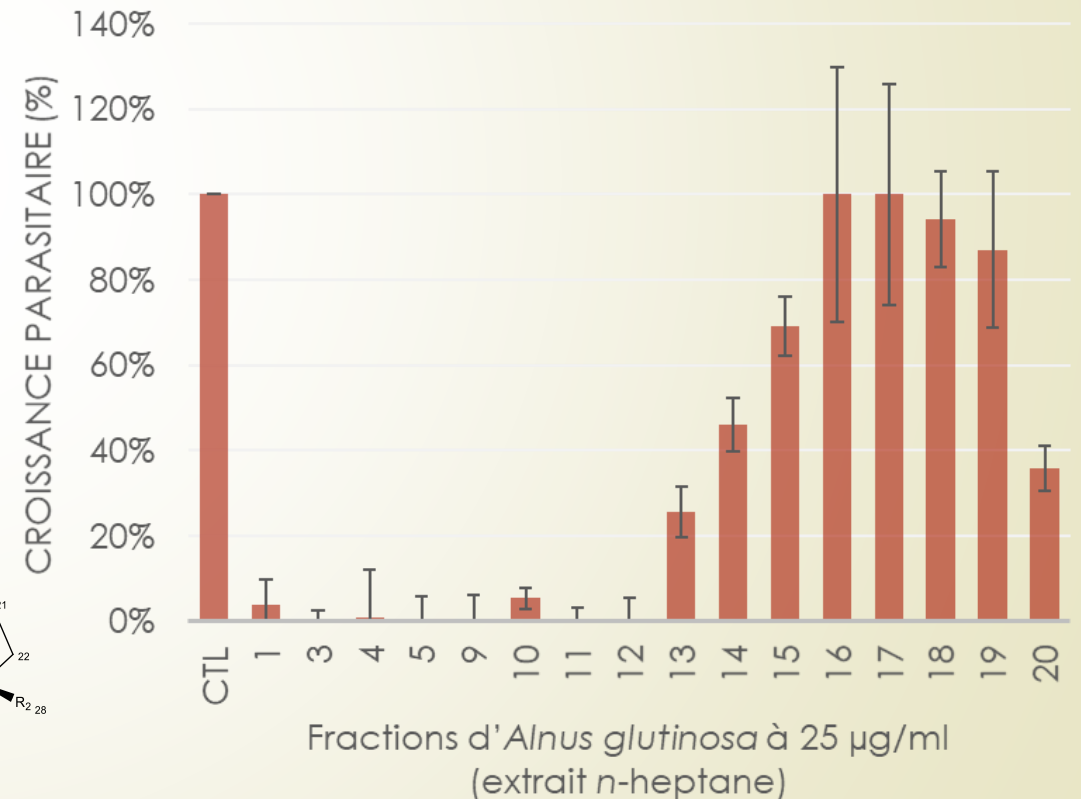
- L'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*)
  - Sur 19 fractions et à 25 µg/mL :
    - 4 sont cytotoxiques (F2, F6, F7 et F8)
    - (> 20% d'inhibition de la croissance des cellules hôtes)
    - **10 fractions inhibent à plus de 50% la croissance parasitaire**

Les premières fractions inhibent entre 95% et 100% de la croissance parasitaire.

- Profilage chimique : les fractions les plus actives contiennent des **dérivés de la bétuline** (lupane)



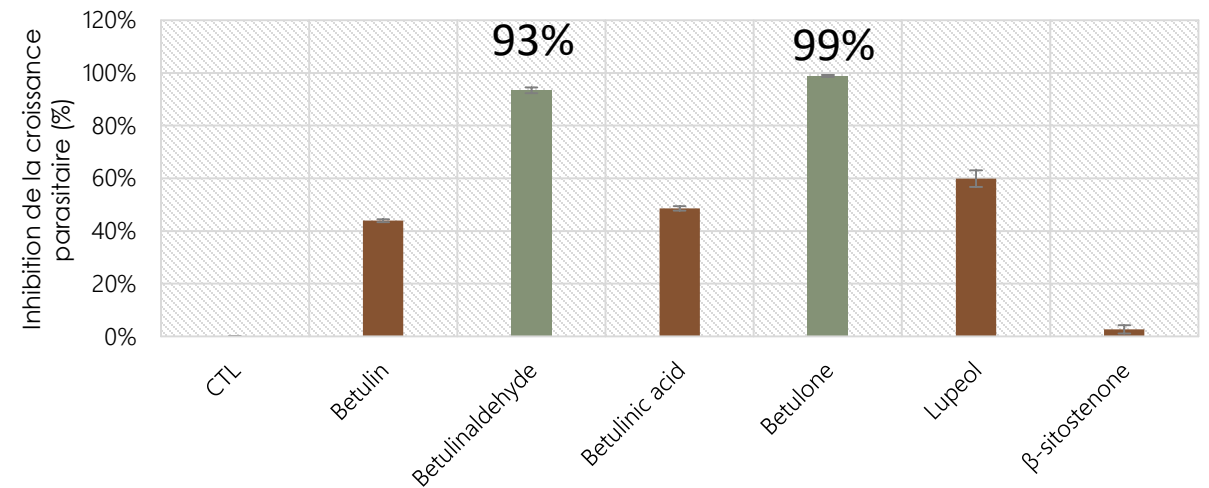
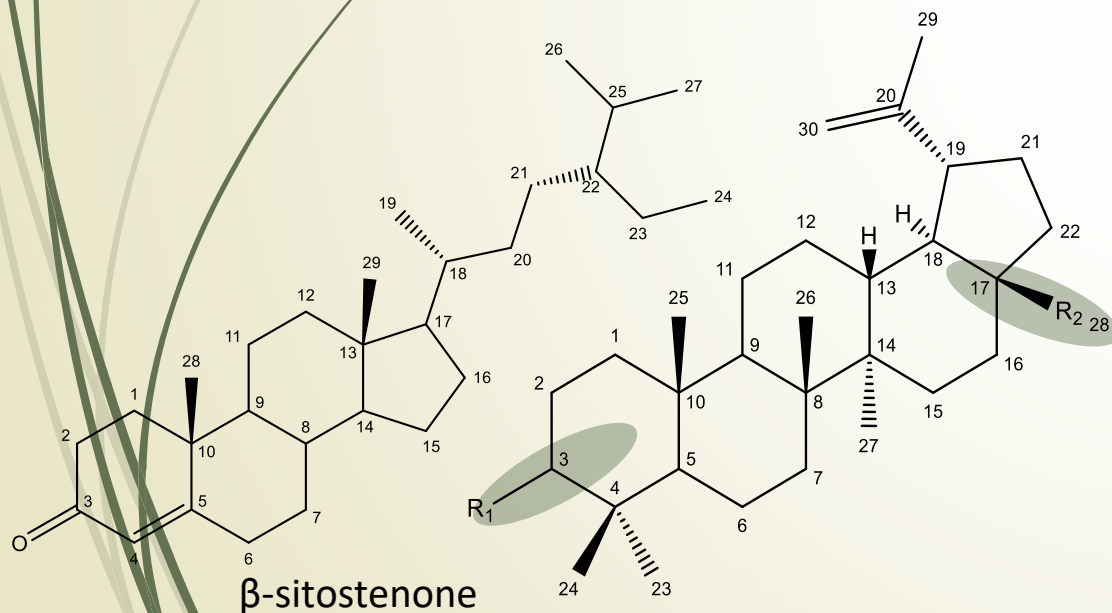
Composition chimique ?





# Chimiosensibilité des composés purs à 10 $\mu$ M

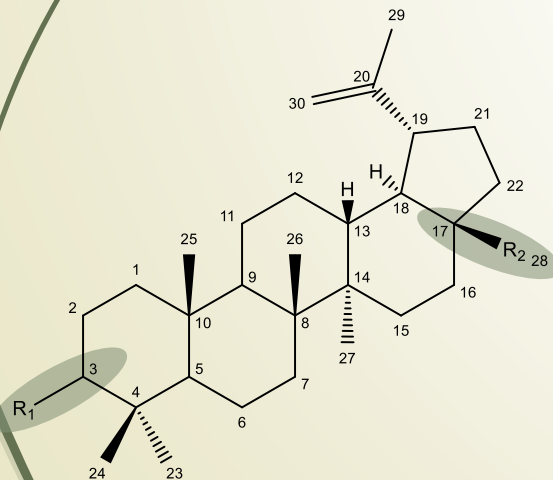
Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Bétuline	$-\beta\text{-OH}$	$-\text{CH}_2\text{OH}$
<b>Bétulinaldéhyde</b>	<b><math>-\beta\text{-OH}</math></b>	<b><math>-\text{CHO}</math></b>
Acide bétulinique	$-\beta\text{-OH}$	$-\text{COOH}$
<b>Bétulone</b>	<b><math>=\text{O}</math></b>	<b><math>-\text{CH}_2\text{OH}</math></b>
Lupéol	$-\beta\text{-OH}$	$-\text{CH}_3$
Lupénone	$=\text{O}$	$-\text{CH}_3$



- La **bétulone** et le **bétulinaldéhyde** sont les composés les plus actifs
- La  $\beta$ -sitosténone (phytostérol) n'a pas d'activité
- La lupénone est insoluble dans nos conditions

# Détermination de la $CC_{50}$ , $CI_{50}$ et calcul de l'IS

Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Bétuline	-β-OH	-CH <sub>2</sub> OH
Bétulinaldéhyde	-β-OH	-CHO
Acide bétulinique	-β-OH	-COOH
<b>Bétulone</b>	<b>=O</b>	<b>-CH<sub>2</sub>OH</b>
Lupéol	-β-OH	-CH <sub>3</sub>
Lupénone	=O	-CH <sub>3</sub>
<b>Acide bétulonique</b>	<b>=O</b>	<b>-COOH</b>
<b>Ester méthylique de l'acide bétulonique</b>	<b>=O</b>	<b>-COOCH<sub>3</sub></b>



➤ Deux composés commerciaux testés : l'acide bétulonique et son ester méthylique

Composés	CC <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	IS
Bétuline	> 80	13.3 ± 7.3	> 6.0
Bétulinaldéhyde	> 80	5.1 ± 0.6	> 15.7
Acide bétulinique	> 80	8.3 ± 2.7	> 9.6
<b>Bétulone</b>	<b>&gt; 80</b>	<b>2.7 ± 1.2</b>	<b>&gt; 29.6</b>
Lupéol	> 80	13.8 ± 4.0	> 5.8
<b>Acide bétulonique</b>	<b>&gt; 80</b>	<b>4.3 ± 1.4</b>	<b>&gt; 18.6</b>
<b>Ester méthylique de l'acide bétulonique</b>	<b>&gt; 80</b>	<b>3.1 ± 0.4</b>	<b>&gt; 25.8</b>
Pyriméthamine	27.7	0.7 ± 0.2	38.0

➤ La bétulone, l'acide bétulonique et son ester méthylique ont des activités du même ordre de grandeur

➤ La cétone en C3 augmente l'activité des triterpènes de type lupane

➤ Leur CI<sub>50</sub> s'approche de celle de la pyriméthamine (utilisée en clinique)

➤ Comment expliquer cette activité ?

➤ Recherche de cibles protéiques *in silico* par docking

- ▶ Le *docking* inverse est le *docking* d'un ligand sur plusieurs récepteurs. Le classement des résultats permet d'identifier la cible la plus probable.
- ▶ **Utilisation d'AMIDE** (Automated Inverse Docking Engine) développé par l'UMR CNRS 7369 MEDyC (Coll. M. Dauchez, S. Baud)
  - ▶ *Docking* inverse sur toute la surface de la protéine (originalité)
  - ▶ Basé sur l'outil AutoDock 4.2
- ▶ **Set de 87 protéines** (Protein Data Bank) créé
- ▶ **3 Protéines sont sorties du lot :**
  - ▶ **CDPK3** (Calcium-Dependent Protein Kinase 3)
    - ▶ Impliquée dans la mobilité, l'invasion et l'échappement
  - ▶ **ENR** (Enoyl acyl carrier reductase)
    - ▶ Intervention dans la biosynthèse des acides gras (FAS II)
  - ▶ **ROP8** (Rhoptry protein 8)
    - ▶ Impliquée dans la formation de la vacuole parasitophore

## Re-docking localisé (150 poses)

Protein (PDB ID)		Bétulone	Acide bétulonique	Ester méthylique de l'acide bétulonique
CDPK3 (3HZT)	POP	149	128	138
	$\Delta G$	-11.52	-9.61	-12.74
	Lig. Eff.	-0.36	-0.30	-0.39
ENR (2O50)	POP	137	85	113
	$\Delta G$	-9.55	-8.89	-10.87
	Lig. Eff.	-0.30	-0.28	-0.33
ROP8 (3BYV)	POP	150	150	139
	$\Delta G$	-9.22	-7.34	-10.39
	Lig. Eff.	-0.29	-0.23	-0.31

La CDPK3 est la cible la plus pertinente.  
Les trois protéines sont retrouvées dans le phylum des apicomplexes.

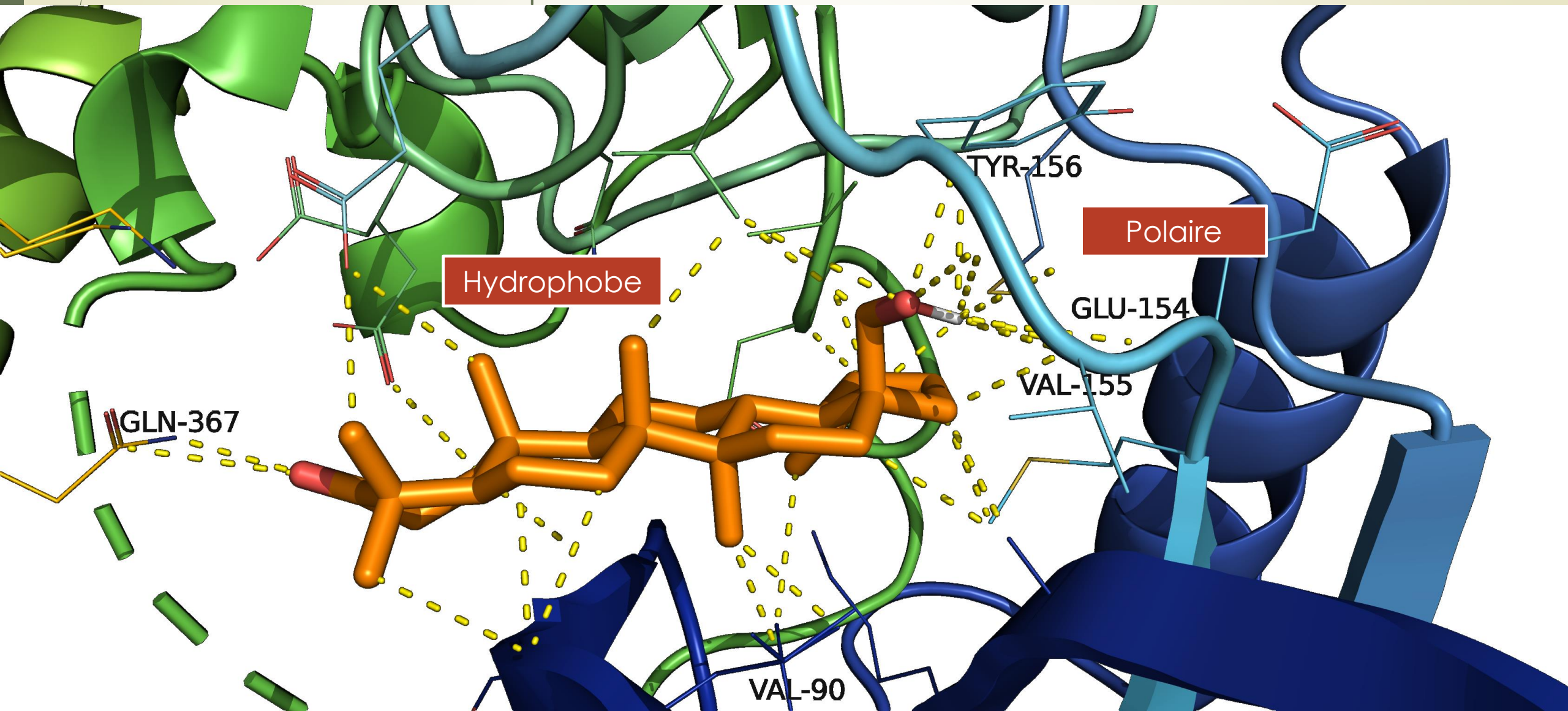


18

## Docking inverse

Recherche de cibles : exemple de visualisation

Complexe CDPK3 – bétulone.  
De multiples interactions sont identifiés par les pointillés jaunes.





# Valorisation de la flore Ivoirienne

- 80 % de la population africaine a recours aux plantes médicinales pour leur soin de santé primaire
- Usage des plantes pour traiter et soigner toutes sortes de pathologies
- La Côte d'Ivoire dispose d'une flore riche en plantes médicinales
- **Collaboration Dr P.A. Yao-Kouassi**, Université de Cocody, Abidjan : Thèses en co-tutelles
- Etudier la composition chimique de plantes médicinales de Côte d'Ivoire, en vue de leur valorisation
  - Usage en médecine traditionnelle
  - Existence de peu de données chimique, biologique et pharmacologique
  - Critères chimiotaxonomiques



# Valorisation de la flore Ivoirienne

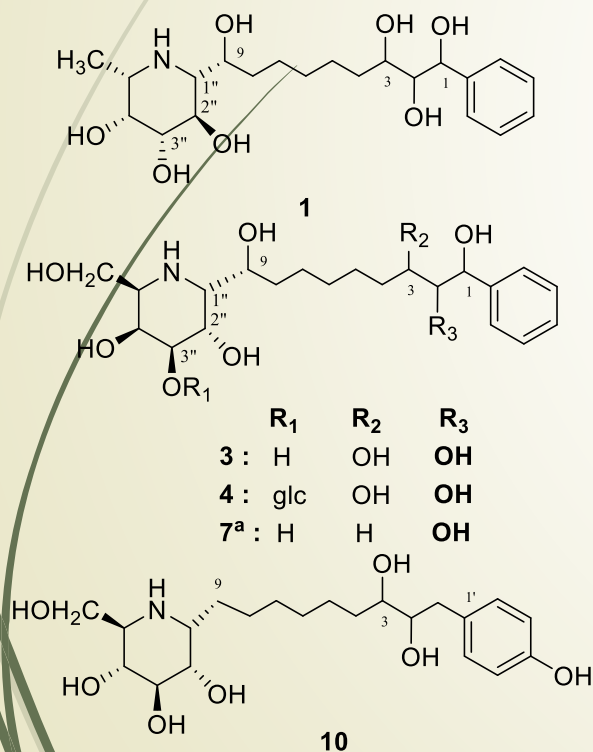


## ➤ *Glyphaea brevis* (Malvaceae)

Thèse Apie Diane P. GOSSAN

- Diarrhée, dysenterie, paralysie, convulsions
- **Coll. J.B. Behr (ICMR) : recherche d'inhibiteurs de glycosidases**
- 10 C-alkyl imminosucres très bon inhibiteurs de glucosidases

- Premiers iminosucres substitués par une chaîne phényle alkyle polyhydroxylée naturels décrits de la famille des Malvaceae



	$\beta$ -glucosidase (almond)	$\alpha$ -fucosidase (bovine kidney)	$\alpha$ -galactosidase (green coffee beans)	$\beta$ -galactosidase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	$\beta$ -mannosidase ( <i>Helix pomatia</i> )
1	3.1 $\mu$ M	29%	–	–	75 $\mu$ M
2	64 $\mu$ M	–	–	–	44%
3	1.7 $\mu$ M	48%	74%	49%	43 $\mu$ M
4	15 $\mu$ M	–	–	–	66%
5	20 $\mu$ M	–	–	–	53%
6	6.4 $\mu$ M	–	–	–	82%
7	1.6 $\mu$ M	35%	76%	18%	57 $\mu$ M
8	6.9 $\mu$ M	–	59%	–	81%
9	68 $\mu$ M	–	–	–	26%
10	0.15 $\mu$ M ( $K_i$ = 31 nM)	–	–	82%	4.5 $\mu$ M



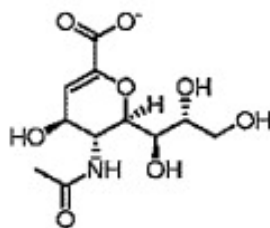
# Valorisation de la flore Ivoirienne



## ➤ *Olyra latifolia* (Poaceae)

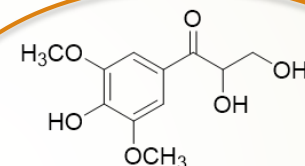
- Stérilité féminine et l'orchite
- Éruptions cutanées, infections, plaies et insecticide
- Diabète

## ➤ Collaborarion Dr. Amar Bennisroune : recherche d'inhibiteurs spécifiques de la NEU-1

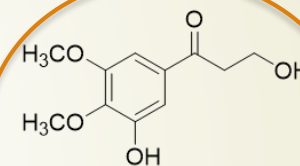


**DANA**

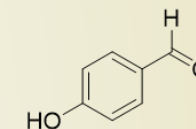
## Thèse Zachée Evariste AKISSI



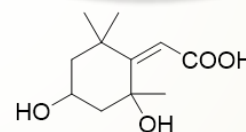
**ol-1** 2,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanone



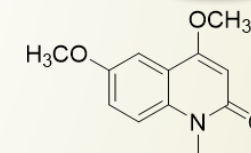
**ol-2** feddeiketone B



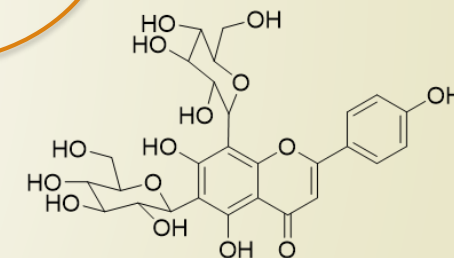
**ol-3** p-hydroxybenzaldéhyde



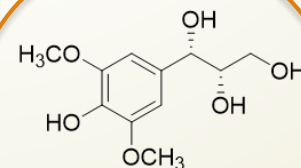
**ol-4** acide 2,4-dihydroxy-2,6,6-triméthyl-cyclohexylidene acetique



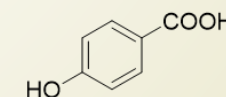
**ol-5** 6-diméthoxy-1-méthyl-quinolin-2-(1H)-one



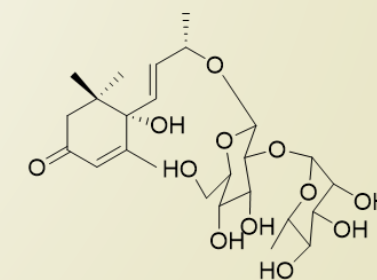
**ol-6** vicénine 2



**ol-7** syringylglycerol



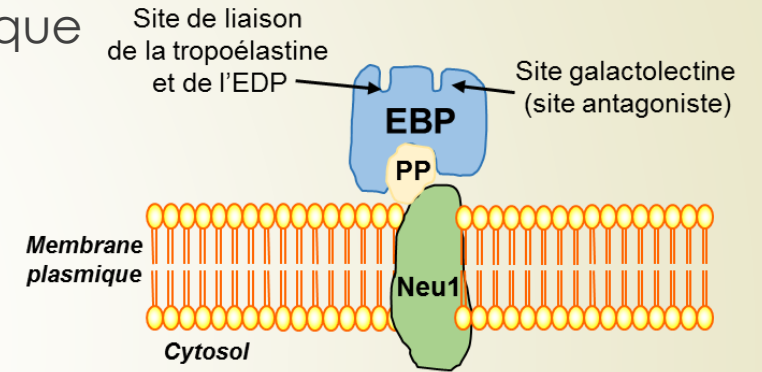
**ol-8** acide p-hydroxybenzoïque



**ol-9** zizyvoside I

## NEU-1 est impliquée dans divers processus biologiques et dans de nombreuses pathologies :

- Neuraminidase (NEU) ou sialidase: hydrolase glycosidique



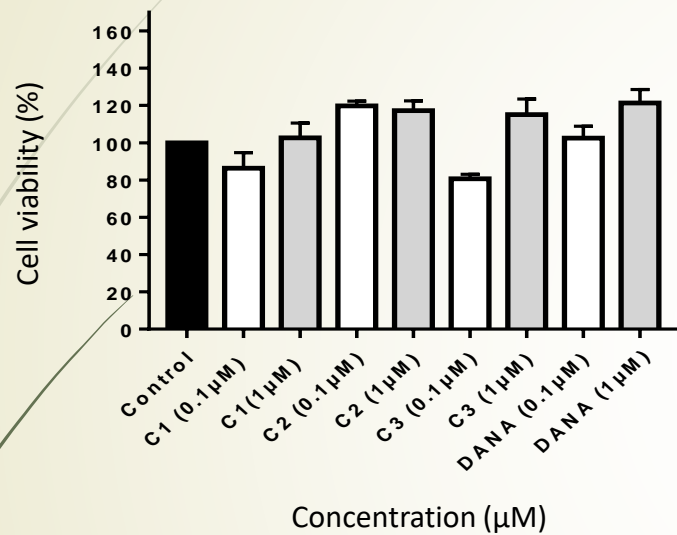
- **Cancer** : pancréas, ovaires, sein, mélanome

- Dégradation de l'élastine corrélée avec les capacités d'invasion de cellules cancéreuses du sein (Salesse et al., 2018)

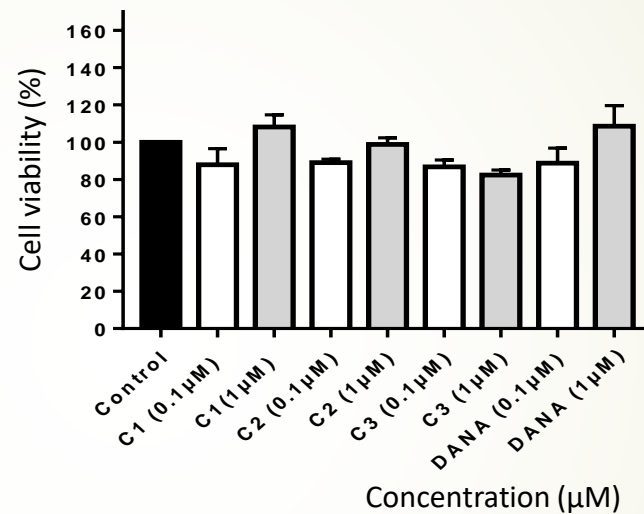
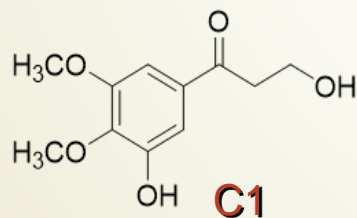
- **Diabète** : Les peptides dérivés de l'élastine (EDPs) sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline

- **Atherosclérose** : Implication des voies de signalisation Neu-1/PI3K $\gamma$  dans le développement de l'athérosclérose

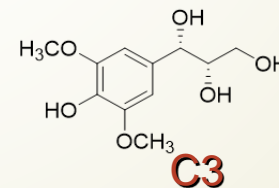
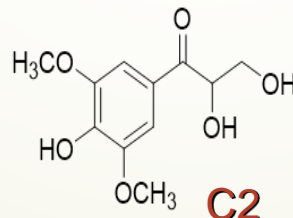
## Effet des composés extraits de végétaux sur la viabilité des deux modèles cellulaires :



**Cellules COS-7**



**Cellules THP-1**



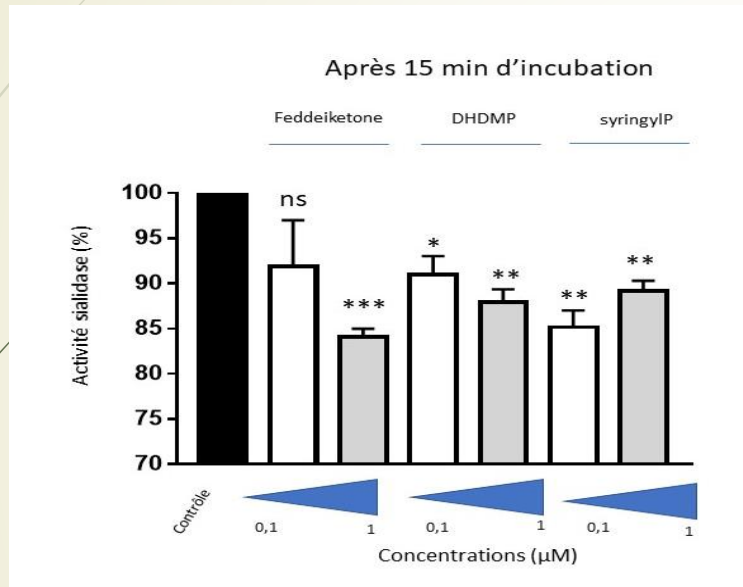
- Cellules COS-7 (lignée de type fibroblaste de rein de singe vert africain) surexprimant NEU-1
- Cellules THP-1 (lignée cellulaire humaine monocyttaire) exprimant NEU-1 de façon endogène

C1 : feddeiketone B  
 C2 : DHDMP  
 C3 : syringylglycerol

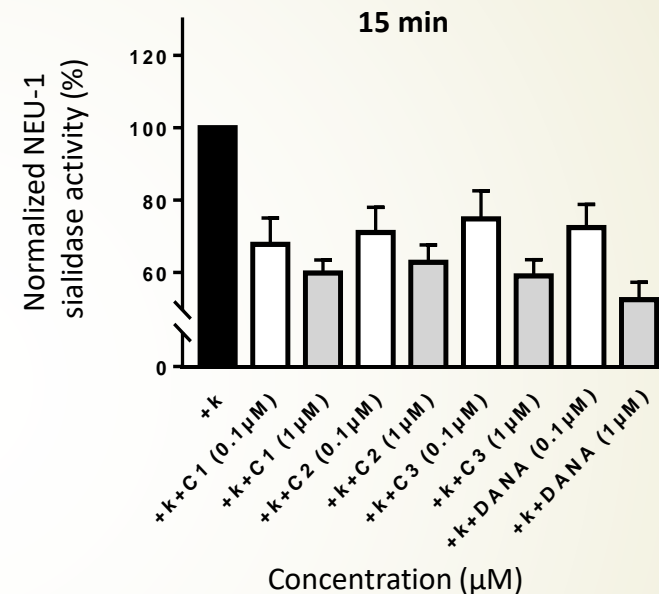
**Pas d'effet significatif des composés retenus sur la viabilité des cellules COS-7 surexprimant NEU-1 et des cellules THP-1**



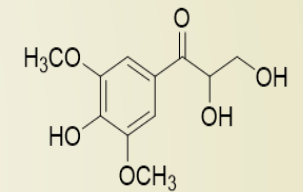
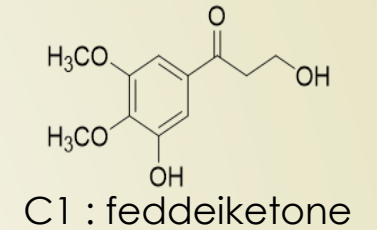
# Evaluation des effets inhibiteurs des molécules extraites sur l'activité sialidase de NEU-1 :



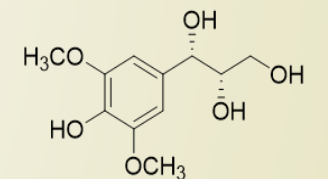
Cellules COS-7



Cellules THP-1



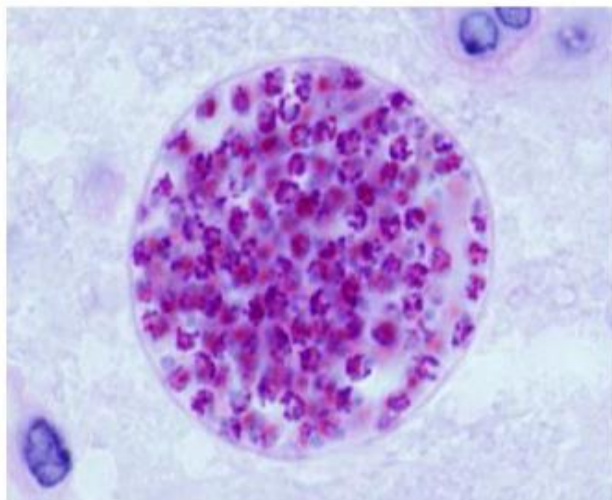
C2 : DHDMP



C3 : syringylglycerol

- Effet inhibiteur des 3 composés sur l'activité sialidase sur les cellules COS-7 avec des effets marqués à 1 μM.
- Effet inhibiteur des composés sur l'activité sialidase induite par la  $\kappa$ -elastine (THP-1)
- Effets comparables voire légèrement supérieurs (pour la concentration 0,1 μM) à ceux obtenus avec le DANA dans les cellules THP-1.

# Valorisation de la flore Ivoirienne



**Chimie des Substances Naturelles**  
**Reims 02/07/2021**



## Réunion d'avancée de thèse

Etude phytochimique et biologique de plantes médicinales antimicrobiennes de Côte d'Ivoire pour une valorisation comme antiparasitaire contre la toxoplasmose et comme antifongique contre *candida auris*.

Pr Laurence VOUTQUENNE NAZABADIOKO

Dr Abdulmagid ALABDUL MAGID

Pr Isabelle VILLENA

HDR Philomène Akoua YAO-KOUASSI

Présenté par :

**Nangouban**  
**OUATTARA**

# Remerciements



## UMR CNRS 7312 – ICMR

Dr. Abdulmagid Alabdul Magid  
Pr Jean-Bernard Behr  
Benjamin Bertaux  
Nicolas Borie  
Dr J. Hubert  
Dr. Jean-Marc Nuzillard  
Dr. Simon Remy  
Pr. Jean-Hugues Renault  
Charlotte Sayagh

## service commun d'analyse

Dominique Harakat  
Carine Machado  
Agathe Martinez  
Anthony Robert



## EA 7510 – ESCAPE / CHU de Reims

Pr. Isabelle Villena  
Dr. Dominique Aubert  
Dr. Sandie Escotte  
Dr. Antoine Huguenin

## UMR 7369 - MEDyC

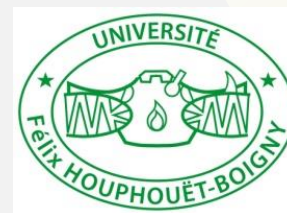
Pr. Manuel Dauchez  
Pr. Stéphanie Baud  
Dr. Nicolas Belloy  
Dr. Marc Gueroult

Pr Laurence Duca  
Dr Nicolas Etique

Dr Amar Bennasroune

## Doctorants :

Z. Evariste Akissi  
Camille Albrecht  
Pierre Darne  
A. Diane Gossan  
Marie Schmitt  
Jeremy Spalenka



Dr. P.A. Yao-Kouassi

**Merci de votre  
attention**