

**Valorisation de biomasses de la forêt boréale par l'étude du potentiel anti-inflammatoire de composés d'origine naturelle pour traiter l'asthme allergique**

**Dr Jean Legault, responsable**

**Line Bouchard, conférencière**

**Laboratoire LASEVE**

**Université du Québec à Chicoutimi**

# Asthme et inflammation

## Asthme

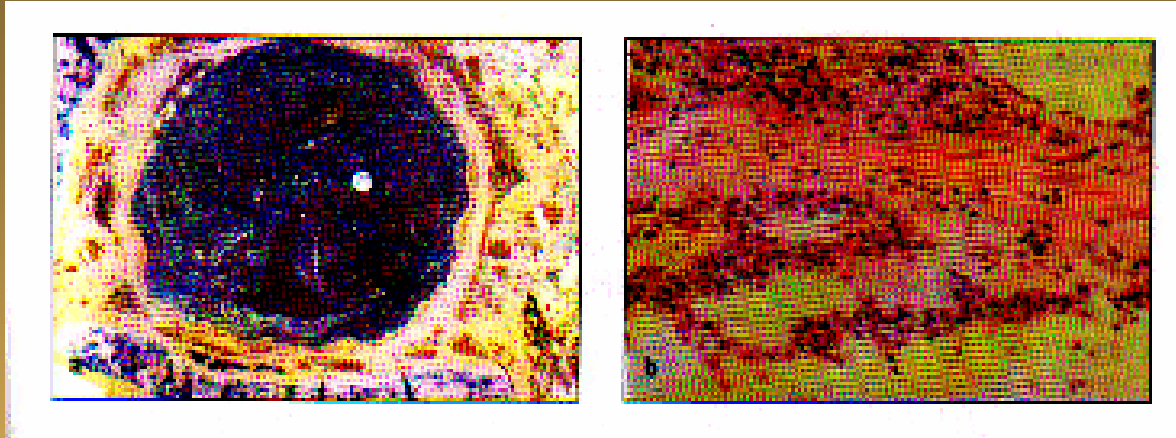
Se définit comme une obstruction réversible, une hyperréactivité des voies aériennes et une inflammation de la muqueuse bronchique.

## Inflammation

Son rôle est d'éliminer l'agent agresseur, de stopper l'atteinte tissulaire et de rétablir l'homéostasie et la fonction du tissu.

Dans l'asthme, l'équilibre est rompue entraînant une anarchie dans la réparation et une chronicité de l'inflammation de même qu'une atteinte fonctionnelle du tissu.

# Asthme et inflammation

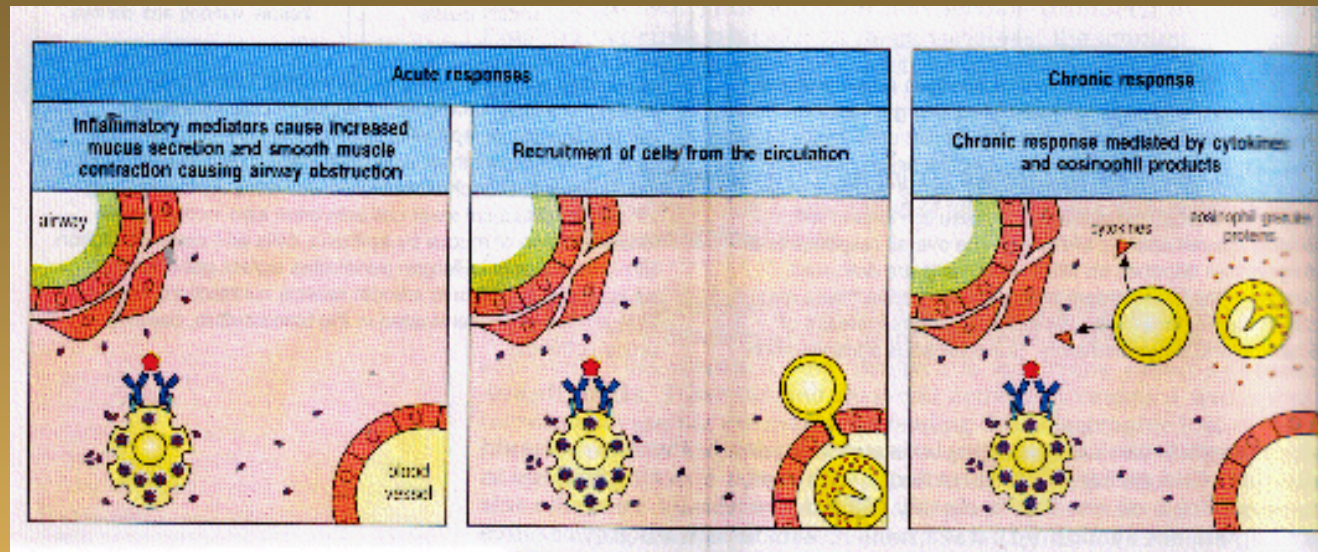


Dans l'asthme allergique, l'allergène provoquera l'activation des mastocytes et des macrophages alvéolaires dans les voies respiratoires inférieures.

Ce qui amènera, dans les secondes suivantes, une constriction des bronches et une augmentation de la sécrétion de mucus. C'est ce qui obstrue les voies respiratoires.

Après la première attaque avec l'allergène, une inflammation chronique s'installe. Elle est caractérisée par la présence continue de lymphocyte de type Th2, d'éosinophiles, de neutrophiles et d'autres leucocytes

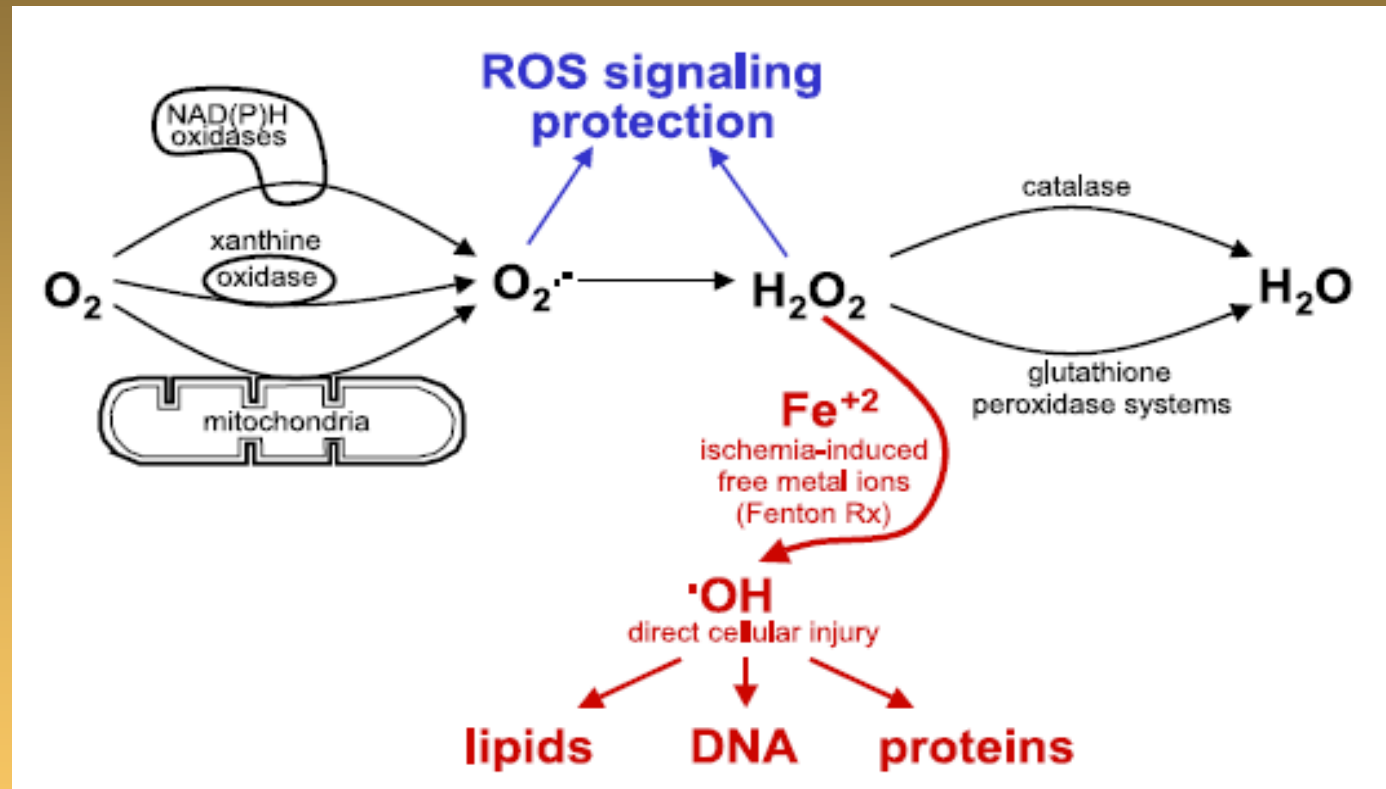
# Asthme et inflammation



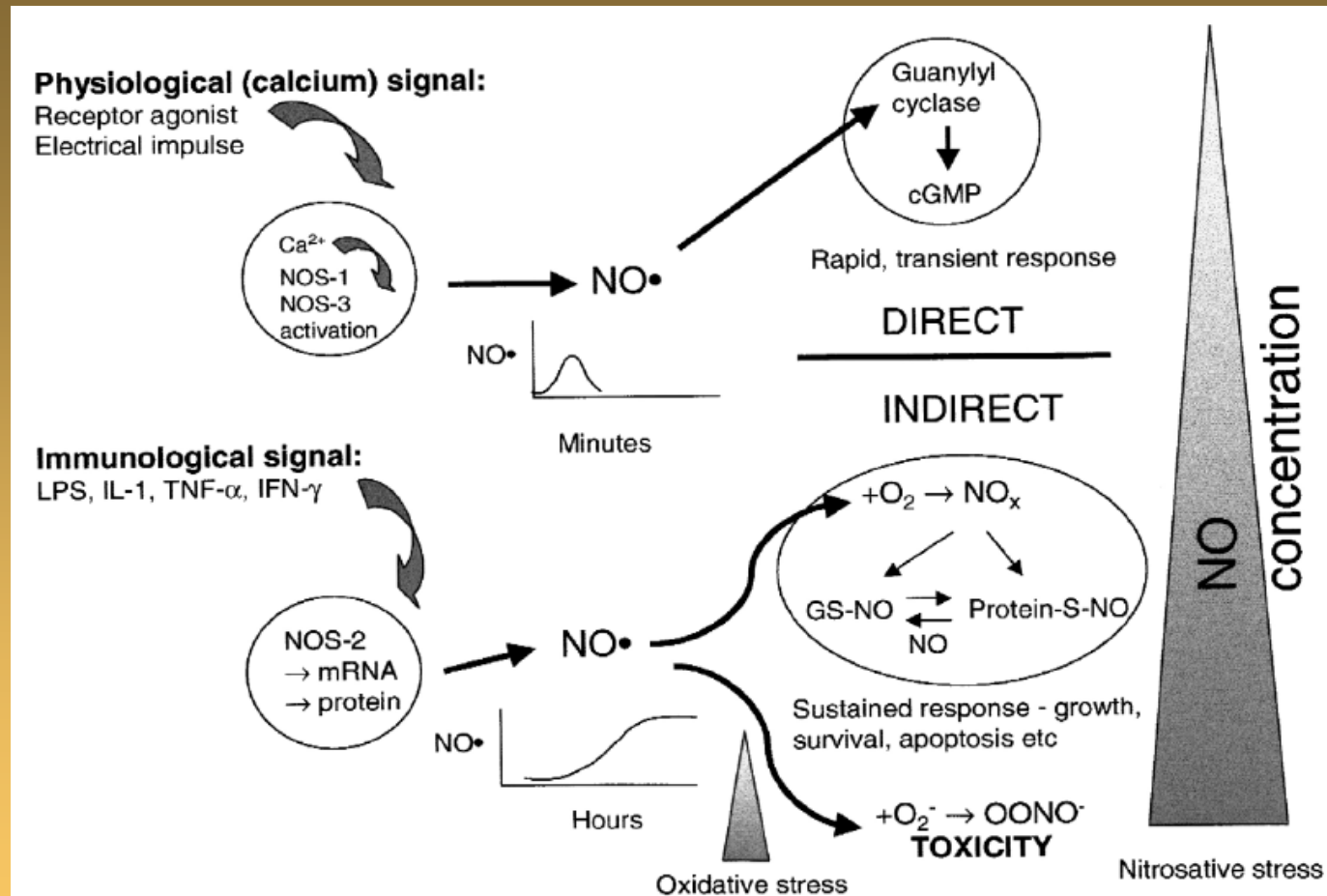
Dans une réaction,

1. le lymphocyte de type Th2 sécrète des cytokines
2. Stimulation de la production d'IgE par les lymphocytes B et stimulation des éosinophiles
3. Sécrétion de médiateurs par les mastocytes grâce aux IgE.
4. Contraction musculaire bronchique
5. Afflux de cellules inflammatoires.
6. Par la stimulation des éosinophiles, il y a libération de cytokines pro-inflammatoires et dégranulation de la cellule provoquant des dommages aux tissus.

# Stress oxydatif : les dérivés actifs de l'oxygène



# Stress oxydatif : les dérivés actifs de l'azote



Coleman, J.W. 2001. International Immunopharmacology. 1: 1397-1406.

# Évaluation *in vitro* de l'activité inflammatoire

Le potentiel anti-inflammatoire des extraits ou des composés a été évalué à l'aide de macrophages de souris Raw264.7 activés par le lipopolysaccharide (LPS) ou l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Les macrophages activés sont impliqués dans le processus inflammatoire et dans les dommages tissulaires.

Les cellules Raw264.7 incubées en présence de LPS, un constituant de la paroi bactérienne, ou d'IFN- $\gamma$ , produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et petits médiateurs comme l'oxyde nitrique (NO)<sup>8</sup>.

Plusieurs études suggèrent que le NO, un dérivé radicalaire réactif, est impliqué dans de nombreux processus pathophysiologiques incluant l'inflammation<sup>9</sup>.

# Évaluation *in vitro* de l'activité inflammatoire

Les quantités de NO ont été déterminées par le dosage du nitrite (NO<sub>2</sub>) produit lors de la réaction du NO avec l'oxygène moléculaire.

Le milieu de culture contenant les nitrites a été incubé pendant 10 minutes avec le réactif de Griess, puis la densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre<sup>8</sup>.

Les quantités de NO générées par les macrophages activés avec le LPS ou l'IFN- $\gamma$  ont été comparées avec celles obtenues avec les macrophages activés et traités en présence d'extraits ou de composés.

La diminution du niveau de NO induit par le traitement a permis de démontrer l'activité anti-inflammatoire des extraits ou des composés.

Le N-omega-nitro-L-arginine (L-NAME), un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthétase, a été utilisé comme témoin positif.

# Les plantes sélectionnées

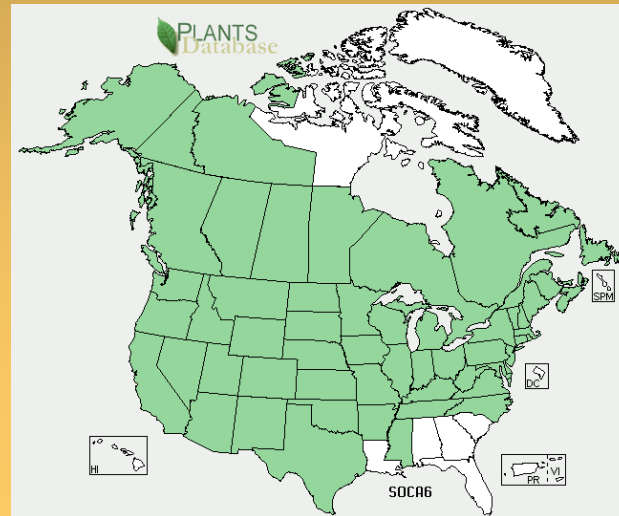
Aulne rugueux (*Alnus rugosa*)  
Bleuet (*Vaccinium angustifolium*)  
Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi*)  
Cèdre blanc (*Thuja occidentalis*)  
Épinette noire (*Picea mariana*)  
Épinette blanche (*Picea glauca*)  
Mélèze (*Larix laricina*)  
Peuplier baumier (*Populus balsamifera*)  
Peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*)  
Pin gris (*Pinus banksiana*)  
Sapin baumier (*Abies balsamea*)  
Thé du Labrador (*Ledum groenlandicum*)  
Utriculaire vulgaire (*Utricularia vulgaris*)  
Verge d'or du Canada (*Solidago canadensis*)



# *Solidago canadensis* (Verge d'or du Canada)



- ❖ Famille des Asteraceae
- ❖ Tige grêle d'environ 30 à 150 cm
- ❖ Feuilles sont minces, alternées et pointues
- ❖ Capitules jaunes de 2 à 2.8 mm
- ❖ Floraison en période estivale persistante jusqu'à l'automne
- ❖ Distribution: partout en Amérique du Nord



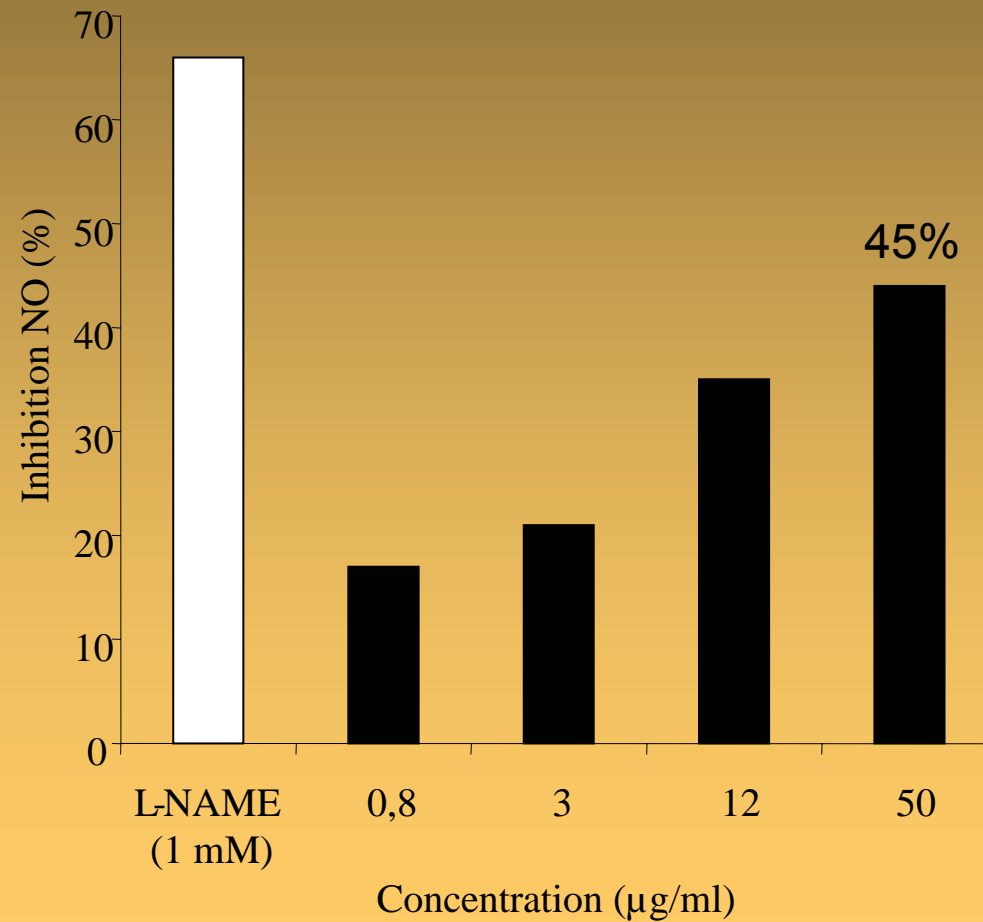
# Utilisation de *Solidago canadensis* en médecine traditionnelle amérindienne



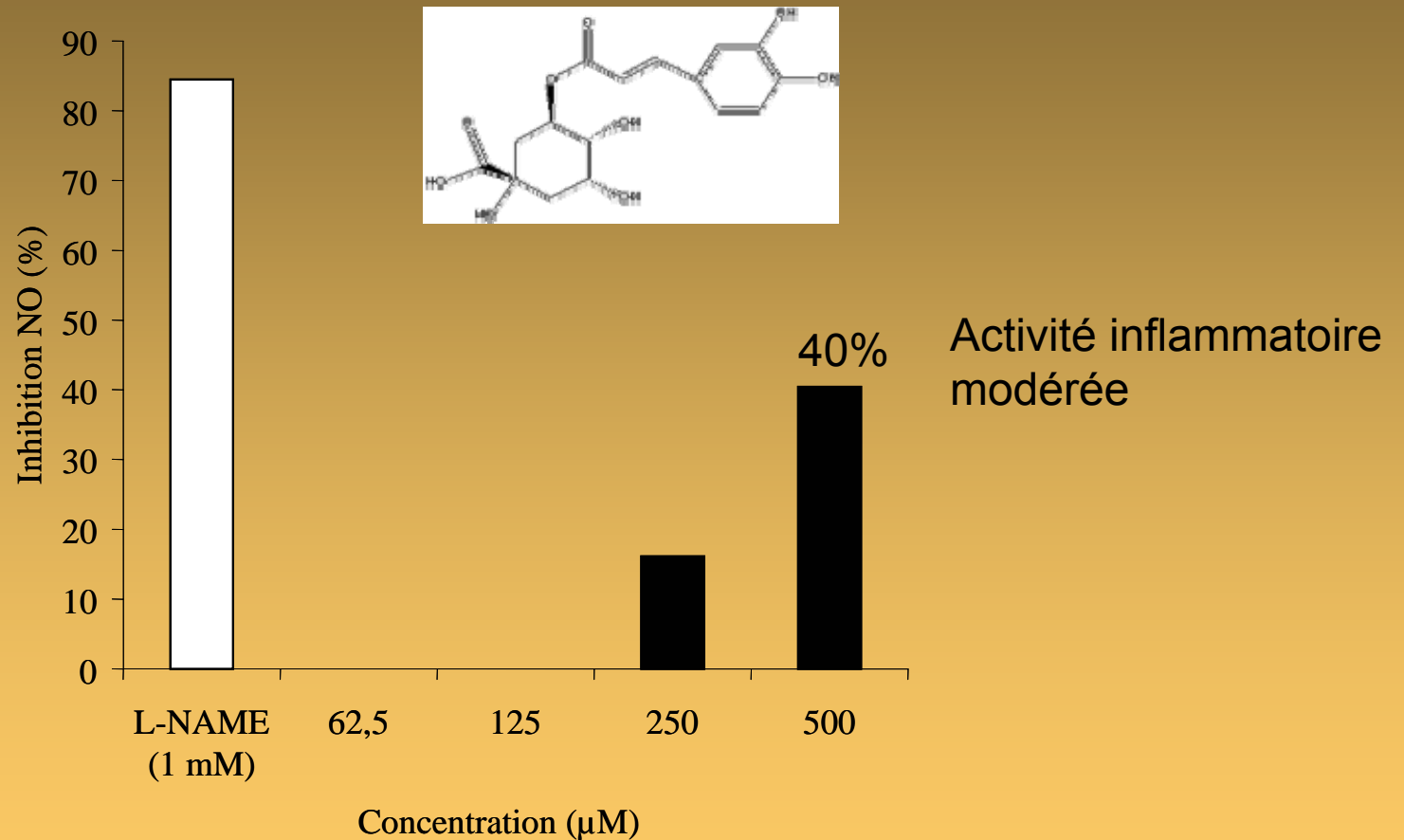
- ❖ Analgésique–Fleurs et racines (Iroquois)
- ❖ Brûlure–Fleurs (Chippewa)
- ❖ Ulcères–Fleurs (Chippewa)
- ❖ Trouble gastrique –Fleurs (Iroquois)
- ❖ Diarrhée–Fleurs (Thompson)



# Activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *Solidago canadensis* (à partir de l'extrait de fleurs)



# Inhibition de la production d'oxyde nitrique par l'acide chlorogénique

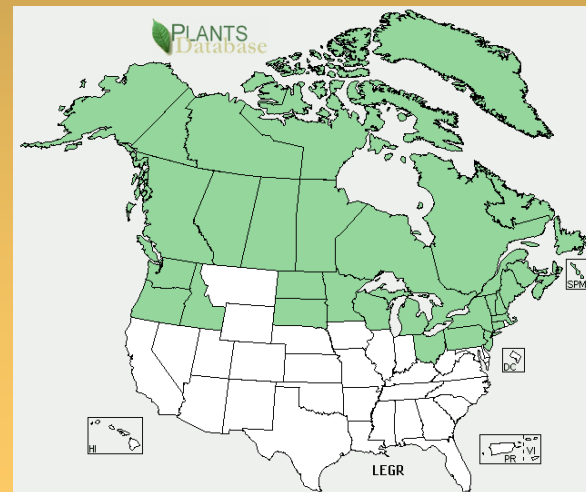


4 autres composés ont été isolés et identifiés

# *Ledum groenlandicum* (Thé du labrador)



- ❖ Arbuste long de 30 à 120 cm de la famille des Ericaceae
- ❖ Floraison printanière
- ❖ Fleur large de 8 à 10 mm
- ❖ Feuilles persistantes
  
- ❖ Distribution : partout au Canada



## Utilisation du *Ledum groenlandicum* en médecine traditionnelle amérindienne

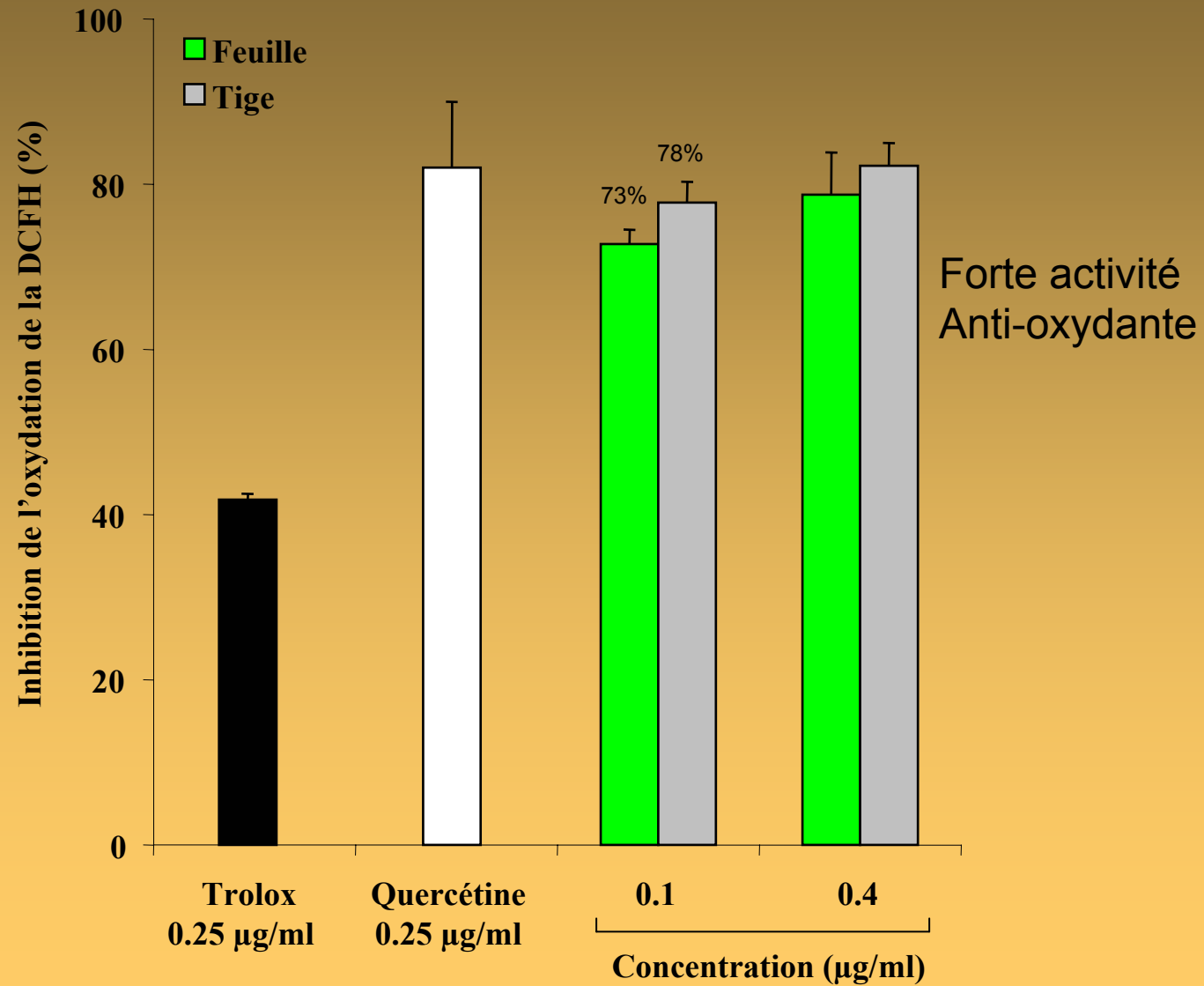
- ❖ **Asthme** – feuilles (Micmac)
- ❖ **Rhumatisme** – fleurs et feuilles (Cree, Quinault)
- ❖ **Brûlures** – racines et feuilles (Cree, Chippewa)
- ❖ **Maladie du foie** – plante entière (Montagnais)
- ❖ **Problèmes aux reins** – feuilles (Malecite, Micmac)



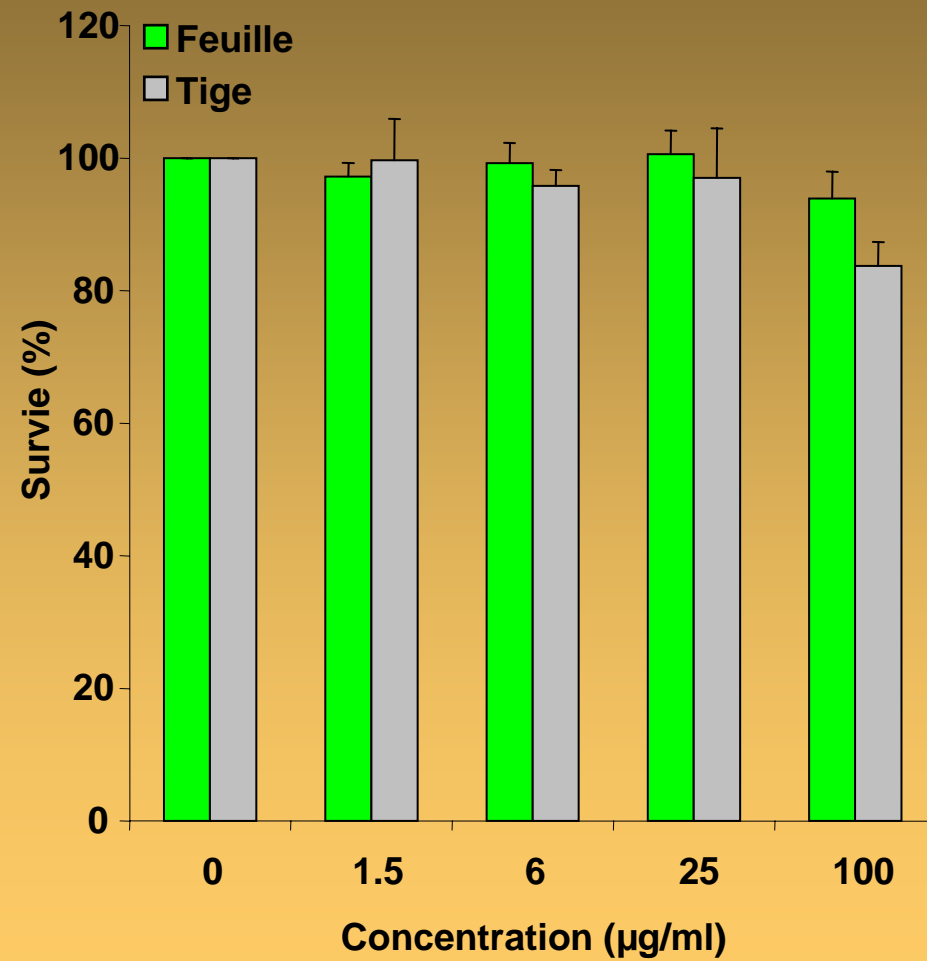
## Extraction méthanolique des feuilles et des tiges de *Ledum groenlandicum*

Échantillons	Rendement (g/100g)	ORAC ( $\mu$ Mol Trolox/mg)	Composés phénoliques totaux (g/100g)
Extrait de feuilles	12	16 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1
Extraits de tiges	12	20 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2
Acide gallique	(-)	13 $\pm$ 3	(-)
Quercétine	(-)	31 $\pm$ 3	(-)

# Activité antioxydante d'extraits de *Ledum groenlandicum* sur des cellules en culture

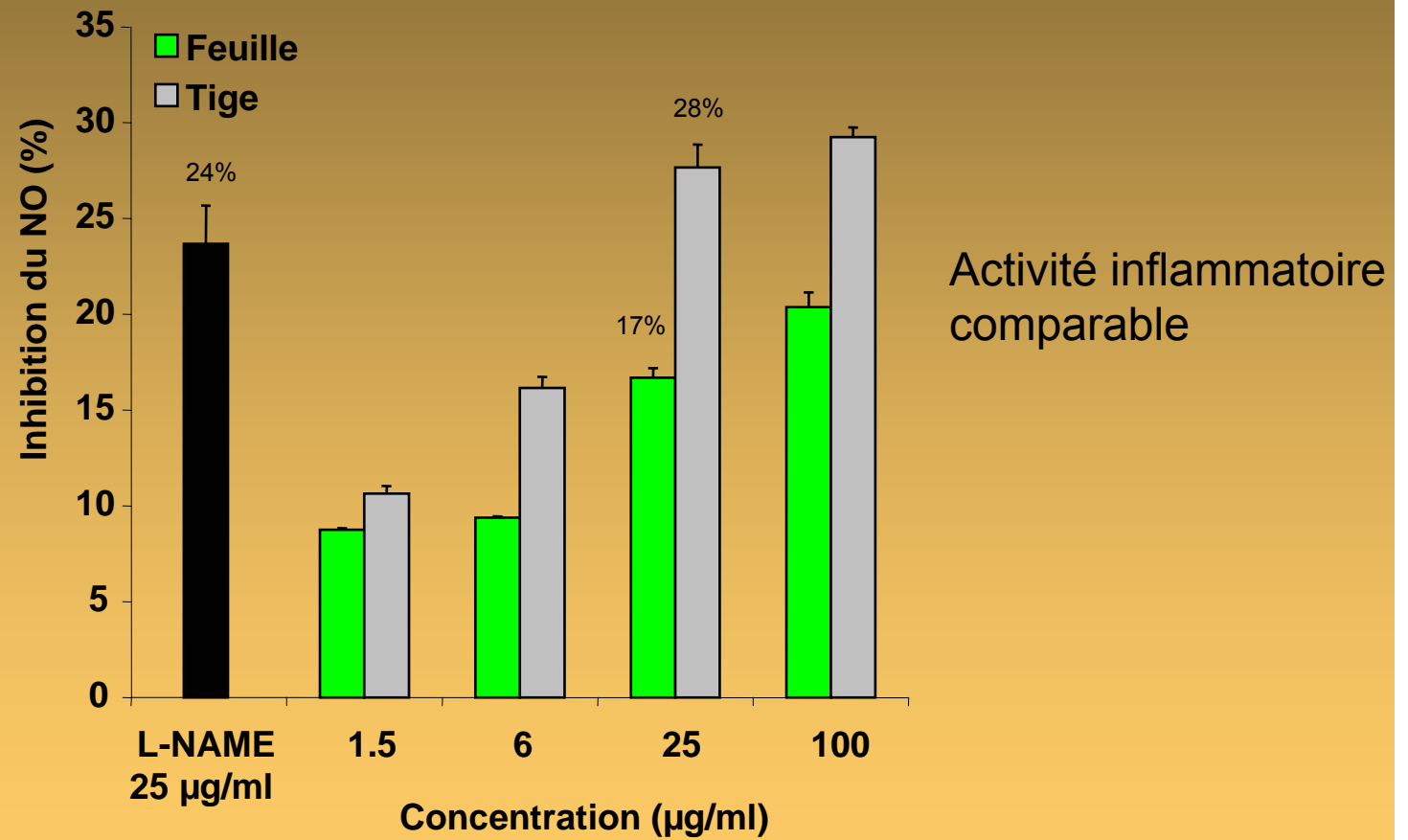


# Effet d'extraits de *Ledum groenlandicum* sur la survie de fibroblastes de peau humaine



Aucune toxicité

# Activité anti-inflammatoire d'extraits de *Ledum groenlandicum*



# Isolation bio-guidée de l'acide ursolique

Tiges *Lédum groenlandicum*

Extraction soxhlet

Fraction hexane  
(inactive)

Fraction diethyl ether  
(active)

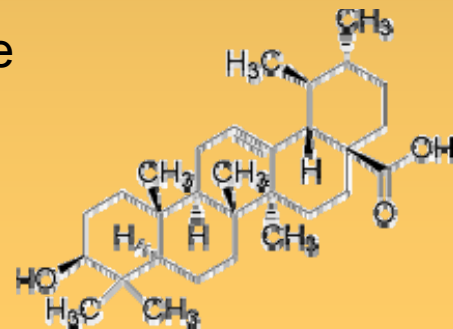
Fraction méthanol  
(inactive)

TLC préparative

Bandes 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Colonne chromatographique

Acide ursolique  
(triterpène)



L'acide ursolique possède  
une activité anti-inflammatoire

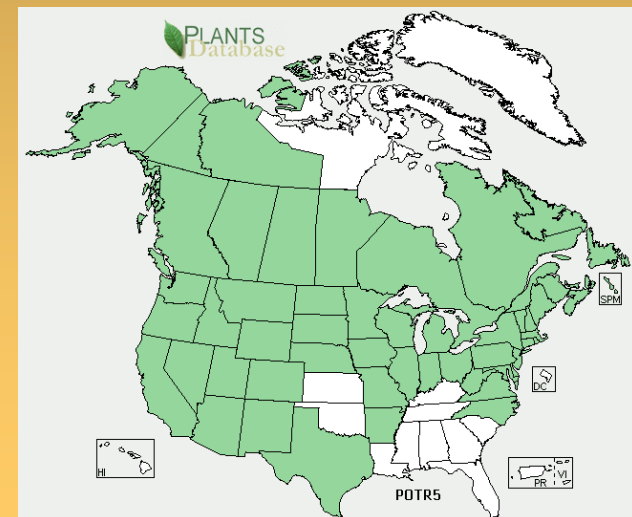
Arch Pharm Res. 2003 26:143-6

# *Populus tremuloide* (Peuplier faux-tremble)



❖ Arbre long de 30 à 120 cm de la famille des Salicaceae

❖ Distribution : partout en Amérique du Nord

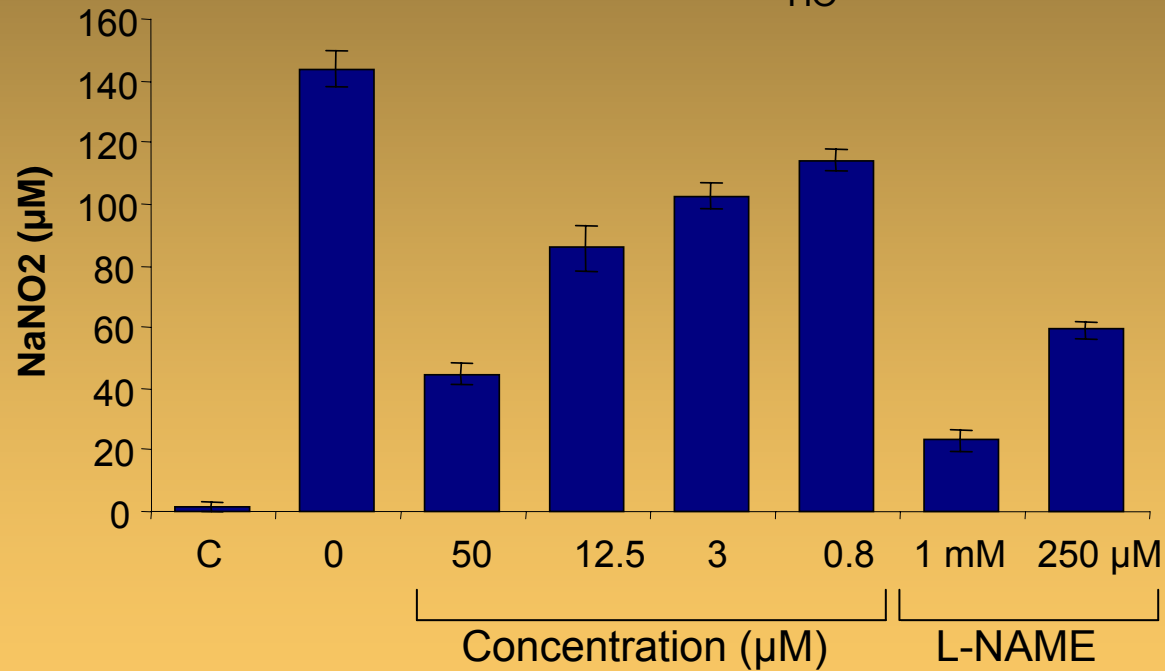
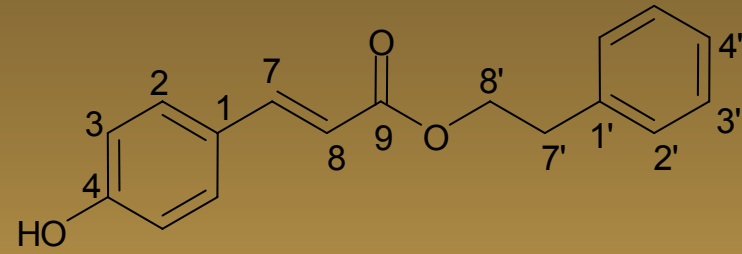


## Utilisation du *Populus tremuloide* en médecine traditionnelle amérindienne

- ❖ **Rhumatisme** – (Algonquin, Okanagon, Thompson)
- ❖ **Brûlures** – écorces (Blackfoot)

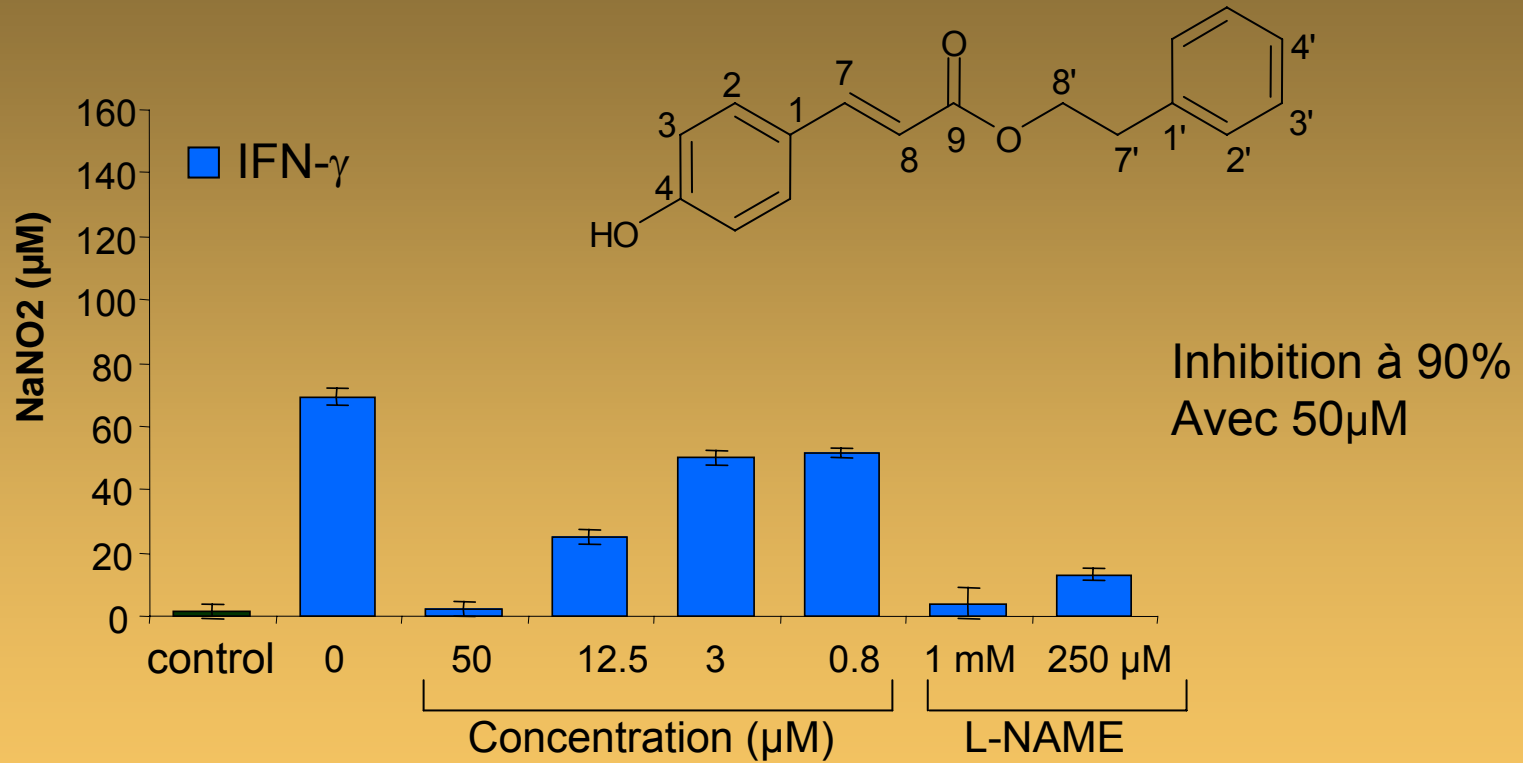


# La Phenethyl coumarate inhibe la production d'oxyde nitrique dans les macrophages stimulés avec le LPS



Inhibition de 60%  
à 50µM

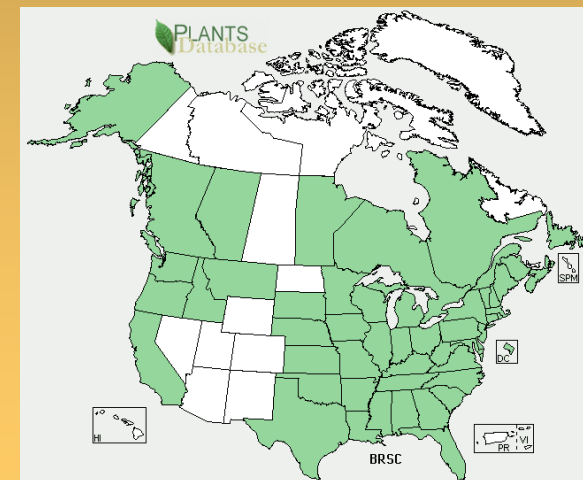
# La Phenethyl coumarate inhibe la production d'oxyde nitrique dans les macrophages stimulés avec l'INF- $\gamma$



# *Brasenia schreberi* (Brasénie de Schreber)



- Plante aquatique à rhizome et rampant de la famille des Cabombaceae .
- Feuilles ovales (long. 5-10 cm larg. 4-5 cm).
- Fleurs pourpre.
- Distribution : États-Unis et Canada



# Utilisation de la *Brasenia schreberi* en médecine traditionnelle

Médecine traditionnelle ( Hartwell, J.L., 1982)

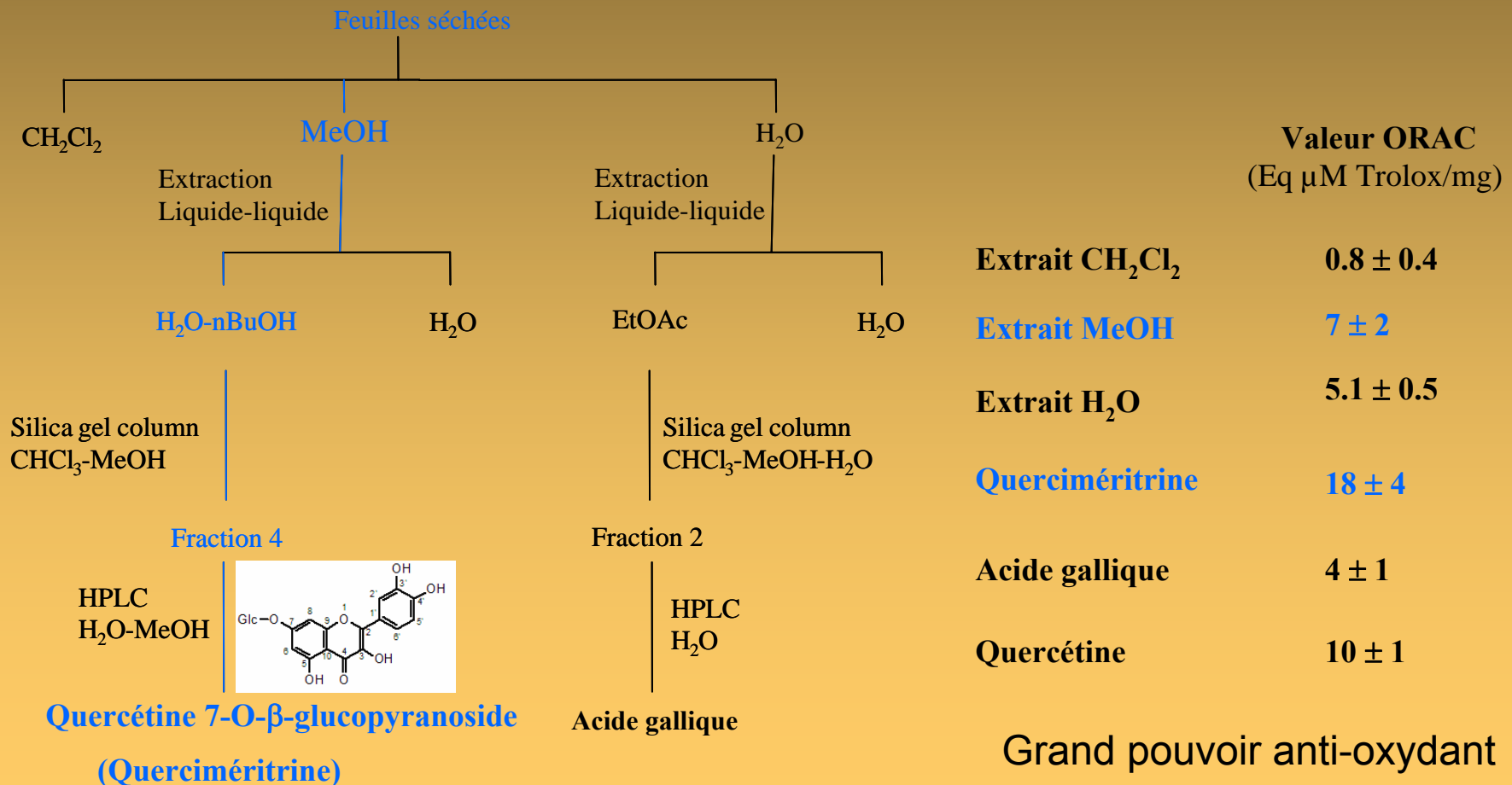
Tuberculose, abcès et dysenterie

- Chine au début XX<sup>iem</sup> siècle:  
Cancer de l'estomac

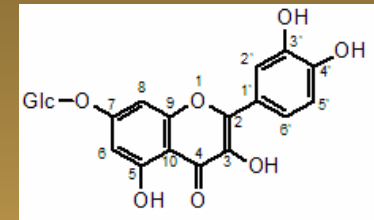
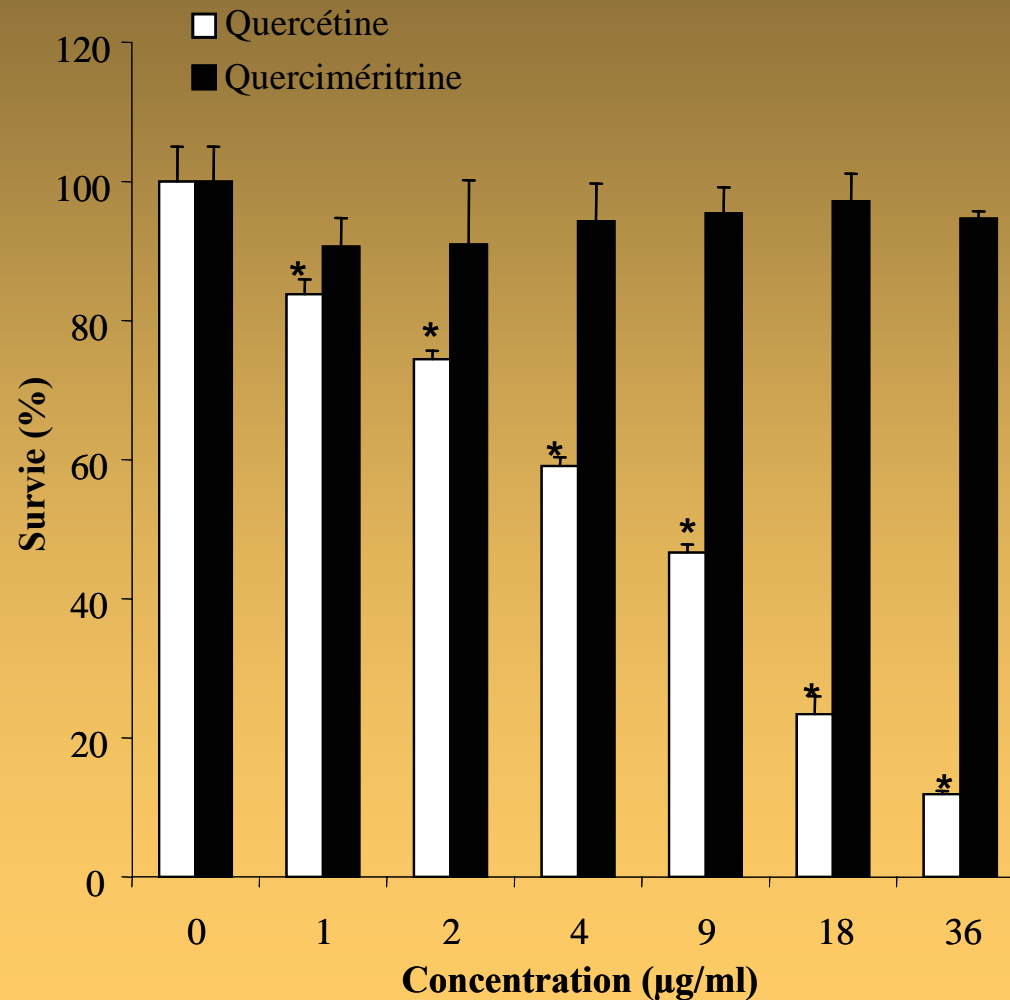


- Isolation d'un composé anti-inflammatoire provenant des feuilles de la *brasenia schreberi*
  - Échantillonnage:
    - Lac Simoncouche, Saguenay
  - Extraction guidée par la bioactivité
  - Isolation par chromatographie

# Isolation bioguidée par l'activité antioxydante de deux composés majoritaires de la *Brasenia*

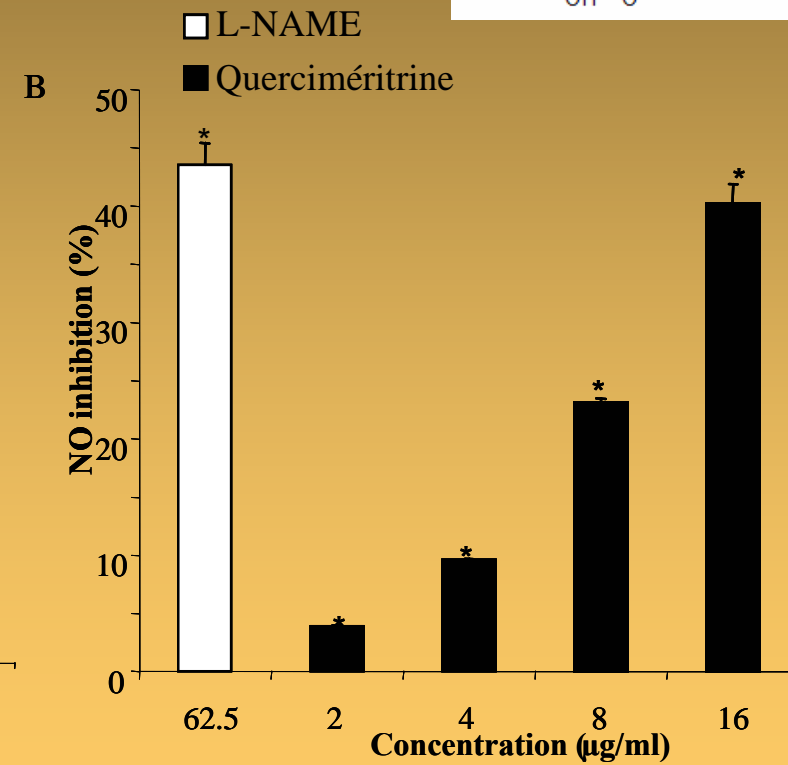
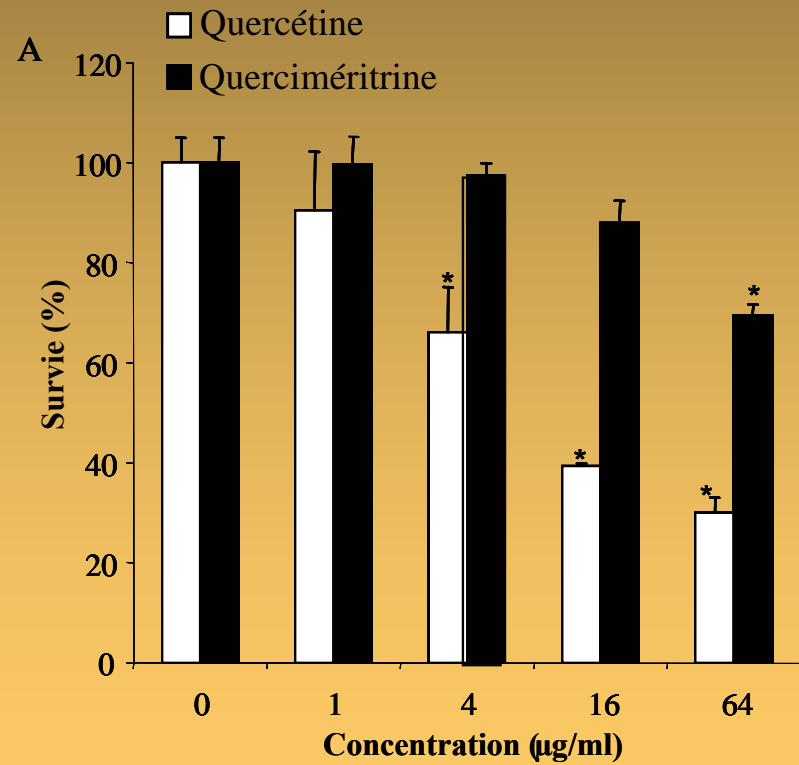
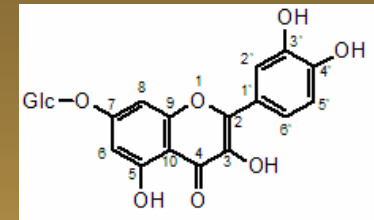


# Cytotoxicité de la querciméritrine sur des fibroblastes de peau humaine



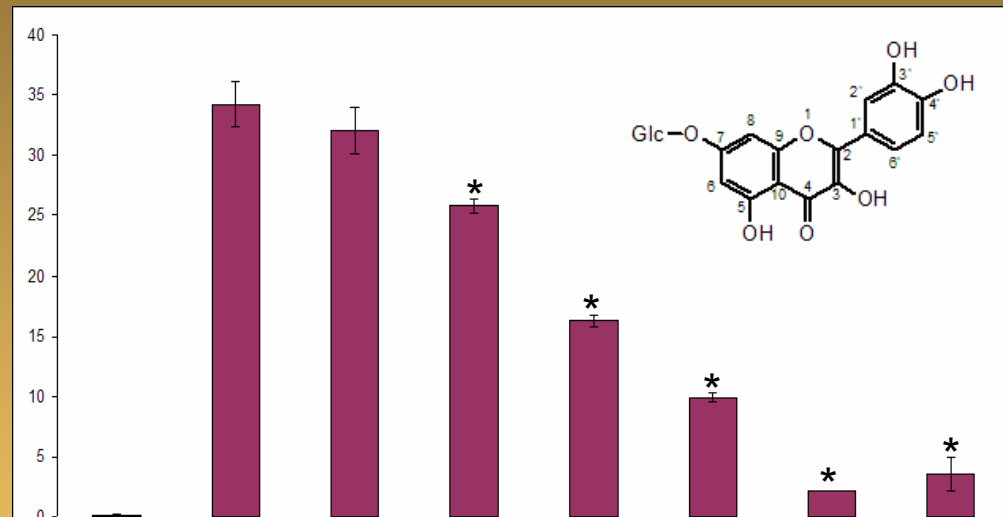
Aucune cytotoxicité

# Cytotoxicité (A) et activité anti-inflammatoire (B) de la querciméritrine sur les macrophages Raw264.7 stimulés avec le LPS



# La querciméritrine inhibe la production d'oxyde nitrique dans les macrophages stimulés avec l'INF- $\gamma$

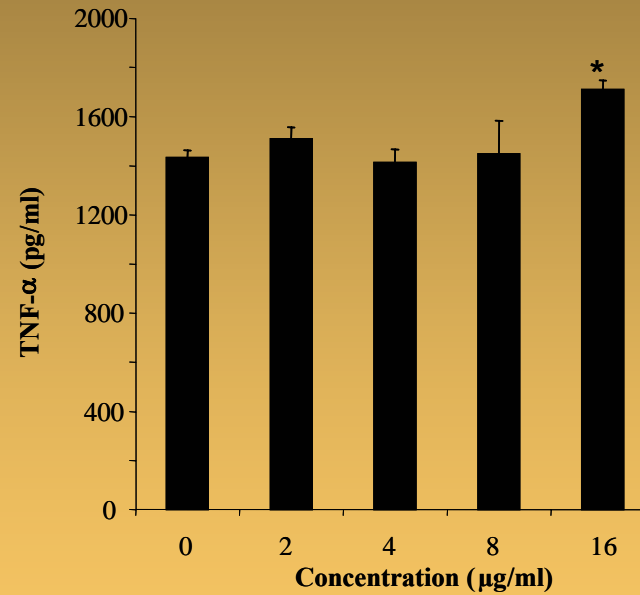
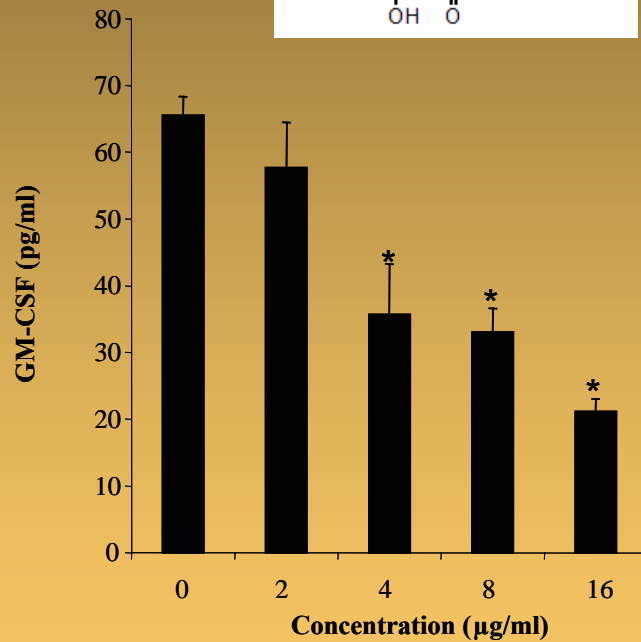
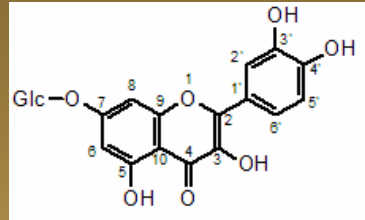
NaNO<sub>2</sub>( $\mu$ M)



\* P < 0,05

Control		IFN- $\gamma$ + Quercimeritrin				L-NAME	
DMEM	IFN- $\gamma$	3.75 $\mu$ g/mL	7.5 $\mu$ g/mL	15 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	1 mM	250 $\mu$ M

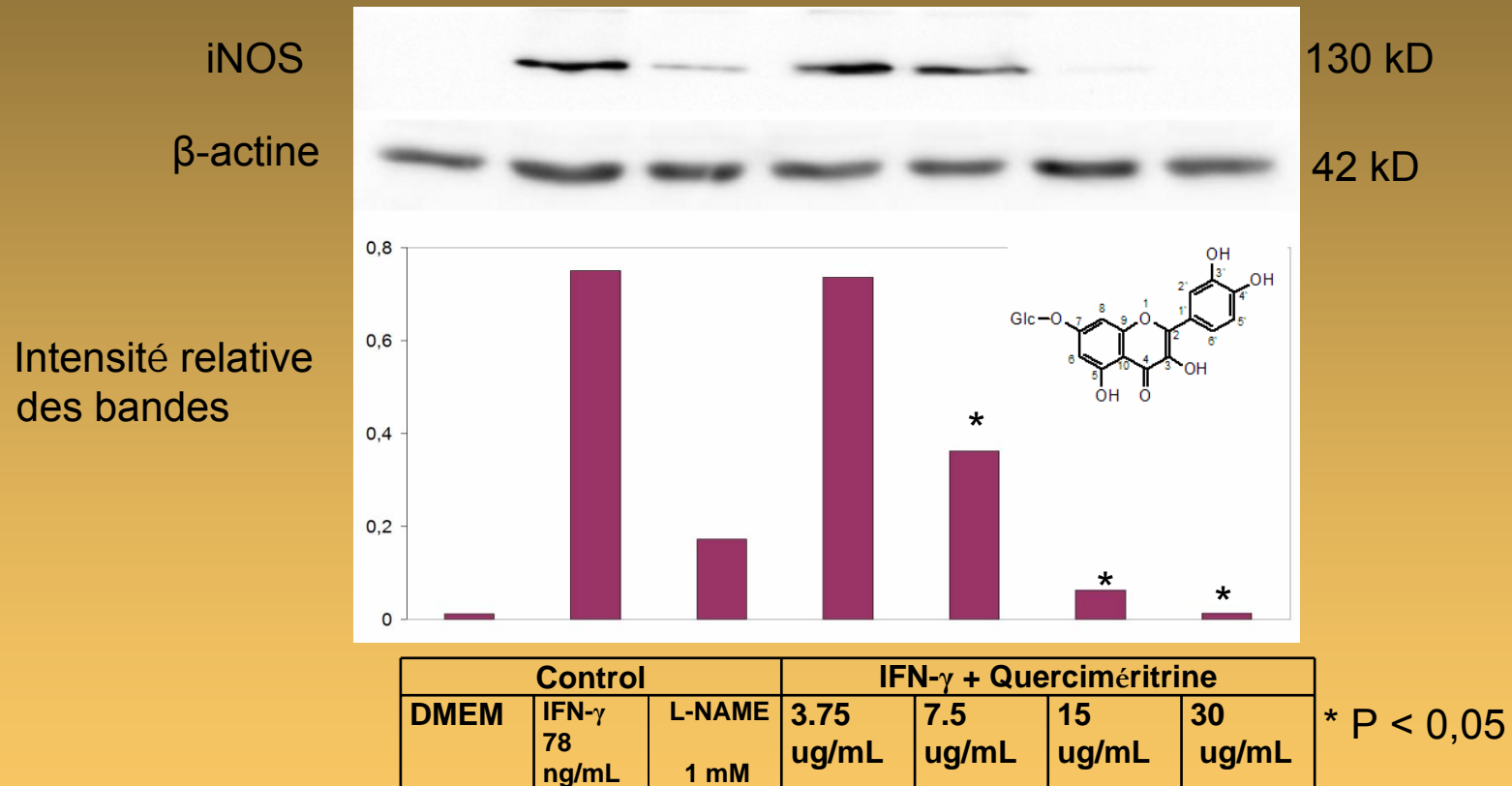
# La querciméritrine inhibe l'induction du GM-CSF dans les macrophages Raw264.7 stimulés avec le LPS



(granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor)

Spécificité d'action

# La querciméritrine inhibe l'expression de iNOS dans les macrophages stimulés avec l'IFN- $\gamma$



- Ratio iNOS sur  $\beta$ -actine
- Dose réponse
- **Même sens que *GRIESS nitric assay***

## Conclusions

-**Valorisation de plusieurs biomasses de la forêt boréale** pour traiter des pathologies inflammatoires.

-**identification de plusieurs plantes ayant des propriétés anti-inflammatoires intéressantes.**

-**Caractérisation de quelques composés responsables de l'activité.** Les extraits et molécules bioactives pourront éventuellement être utilisés pour des **applications pharmaceutiques et nutraceutiques.**

-Au niveau économique, ce projet a permis de valoriser plusieurs plantes de la forêt boréale et de trouver de **nouvelles applications** dans plusieurs secteurs de pointe.

Les résultats de cette recherche pourraient avoir, à moyen terme, une **incidence sur le développement économique de la région du Saguenay–Lac-St-Jean et sur la création d'emploi de haute technologie en région.**

## Conclusions

-Au niveau scientifique, ce projet a permis **d'acquérir de nouvelles connaissances** sur la composition chimique et l'activité anti-inflammatoire de **plusieurs espèces végétales de la forêt boréale**.

-Une partie des résultats de cette recherche a été publiés dans des revues internationales.

-Ce projet de recherche a également favorisé la **formation de jeunes chercheurs**.

-Des **études supplémentaires devront être menées** afin de compléter le développement pharmaceutique et nutraceutique des extraits et composés prometteurs.

# Remerciements

Le Fonds de la recherche forestière  
du Saguenay-Lac-Saint-Jean

Fonds de recherche sur la nature et les technologies