

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

1. PROBLÉMATIQUE

Les produits d'origine naturelle occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments¹. On estime que près de 50 % des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles (plantes, champignons, animaux, etc.)¹. On estime également que moins de 10 % des espèces végétales ont été étudiées pour leurs activités biologiques¹. Ces chiffres indiquent que l'étude approfondie de la biomasse végétale de la forêt boréale pourrait mener à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques. Le taxol® est un exemple qui démontre l'importance des produits d'origine naturelle dans la pharmacopée actuelle. Cet agent anticancéreux a été initialement identifié dans les écorces de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) et ensuite dans la majorité des différentes espèces d'if dont celui du Canada (*Taxus canadensis*). La demande en taxol® a connu une forte croissance au cours des années 90 et les ventes ont atteint plus de 2 milliards de dollars US en 2000. Au Québec, la forêt boréale constitue une source potentielle importante de nouveaux agents thérapeutiques. La forêt boréale couvre 71 % de la superficie du Québec et on y dénombre environ 850 espèces végétales différentes. Bien que cette biomasse végétale soit une source très prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments, très peu d'études ont porté sur l'analyse chimique détaillée et sur le potentiel biopharmaceutique des espèces végétales de cette ressource, en particulier dans le domaine des anti-inflammatoires. Pourtant, plus d'une vingtaine d'espèces végétales étaient utilisées par les amérindiens d'Amérique du Nord notamment pour des applications anti-inflammatoires². Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié le potentiel anti-inflammatoire d'extraits et de composés d'origine naturelle obtenus à partir de plusieurs espèces végétales de la forêt boréale afin de développer de nouveaux agents pour traiter l'asthme allergique.

En 2001, on dénombrait au Canada plus de 2 millions de personnes asthmatiques³. Cette maladie chronique des bronches est caractérisée par une hétérogénéité clinique. Sa définition est basée sur les principales caractéristiques cliniques, physiopathologiques et histopathologiques: une obstruction réversible, une hyperréactivité des voies aériennes et une inflammation de la muqueuse bronchique⁴. La reconnaissance du rôle de l'inflammation dans la physiopathologie de l'asthme et de ses conséquences à long terme a conduit à l'évaluation des bases cellulaires de cette maladie⁵. L'inflammation est un processus très bien orchestré qui fait partie des mécanismes de défense naturels. Le rôle de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur, de stopper l'atteinte tissulaire et, par la suite, de rétablir l'homéostasie et la fonction du tissu. Cependant, dans certaines circonstances, l'équilibre homéostatique est rompu entraînant une anarchie dans la réparation et, par la même occasion, une chronicité de l'inflammation de même qu'une atteinte fonctionnelle du tissu. Les événements cellulaires responsables de ces désordres, bien qu'étant le sujet de recherche de plusieurs équipes de chercheurs, demeurent inconnus. Dans l'asthme, l'interaction des cellules inflammatoires avec les cellules constitutives de la paroi bronchique (cellules résidentes) et la matrice extracellulaire provoque probablement des changements morphologiques et fonctionnels qui contribueront au développement de l'hyperréactivité et à la symptomatologie lorsque ces altérations seront devenues assez importantes et chroniques. Ainsi, la muqueuse bronchique subit des altérations structurales importantes caractérisées entre autres par une hyperplasie du muscle lisse, une fibrose sous-épithéliale et une altération de la matrice extracellulaire de la muqueuse bronchique⁶. Les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques révèlent un infiltrat de cellules inflammatoires, principalement composé de lymphocytes, d'éosinophiles, de mastocytes, de macrophages et de monocytes. Le macrophage alvéolaire sera utilisé comme modèle dans le présent projet. En effet, cette cellule est présente dans les voies aériennes et dans la muqueuse bronchique, et elle serait l'un des principaux agents de régulation de l'inflammation⁷. Dans l'asthme, les macrophages participeraient aux mécanismes inflammatoires par divers mécanismes⁷.

2. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet de recherche visait à valoriser la biomasse de la forêt boréale par l'étude du potentiel anti-inflammatoire de composés d'origine naturelle issus de la forêt boréale. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé les objectifs spécifiques suivants: **i)** l'extraction des composés par différentes méthodes éprouvées dans notre laboratoire; **ii)** l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire des extraits *in vitro*; **iii)** l'identification de plusieurs composés responsables de l'activité des extraits; **iv)** l'évaluation de l'innocuité des extraits et des composés sur des cellules en culture; et **v)** l'optimisation des méthodes d'extraction et de purification des composés bioactifs en vue d'un développement industriel et commercial. Plusieurs espèces végétales utilisées pour des applications anti-inflammatoires par les Montagnais, les Iroquois et les Algonquins ont été ciblées dans le cadre de cette étude³. Les espèces que nous avons étudiées sont : l'épinette noire (*Picea mariana*) et blanche (*Picea glauca*), le sapin baumier (*Abies balsamea*), le mélèze (*Larix laricina*), le cèdre blanc (*Thuja occidentalis*), le pin gris (*Pinus sylvestris*) le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) et baumier (*Populus balsamifera*), le bleuet (*Vaccinium angustifolium*), la verge d'or du Canada (*Solidago canadensis*), le thé du Labrador (*Ledum groenlandicum*), l'aulne rugueux (*Alnus rugosa*) et l'utriculaire vulgaire (*Utricularia vulgaris*)². Les espèces végétales mentionnées ont été très peu étudiées pour leur composition chimique et leur activité biologique.

3. MÉTHODOLOGIE

Les espèces végétales ont été récoltées à la station de recherche Simoncouche de l'Université du Québec à Chicoutimi. Les extraits ont été obtenus par macération des plantes séchées et broyées dans divers solvants. 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- γ (IFN- γ). 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 membrane bactérienne, ou d'IFN- γ , produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et petits médiateurs comme l'oxyde nitrique (NO)⁸. Plusieurs études suggèrent que le NO, un dérivé radicalaire réactif, est impliqué dans de nombreux processus pathophysiologiques incluant l'inflammation⁹. Les quantités de NO ont été déterminées par le dosage du nitrite (NO₂) 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 spectrophotomètre⁸. Les quantités de NO générées par les macrophages activés avec le LPS ou l'IFN- γ 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 extraits les plus actifs ont été fractionnés à l'aide de différentes approches chromatographiques afin d'isoler les composés responsables de l'activité. Les composés ainsi purifiés ont été identifiés par résonance magnétique nucléaire (RMN).

4. RÉSULTATS OBTENUS

Parmi les plantes sélectionnées, plusieurs ont démontré un potentiel anti-inflammatoire intéressant. Les plantes les plus actives étaient *Solidago canadensis*, *Ledum groenlandicum*, *Brasenia schreberi* et *Populus tremuloides*. Notre travail a principalement porté sur l'isolation des composés responsables de l'activité anti-inflammatoire de ces quatre plantes. D'autre part, nous avons également évalué l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés hémi-synthétiques obtenus à partir de molécules qui ont été isolées dans l'écorce de *Betula papyrifera* (bouleau blanc).

4.1 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *S. canadensis* et isolation de composés bioactifs.

S. canadensis est une plante herbacée abondante dans la forêt boréale. L'objectif de ces travaux était d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des tiges et des fleurs et d'identifier le ou les composés responsables de cette activité. Nous avons d'abord procédé à l'extraction par solvant des composés présents dans les tiges et les feuilles. Le potentiel anti-inflammatoire des extraits a ensuite été évalué en mesurant l'inhibition de l'oxyde nitrique (NO) produite par des macrophages de souris Raw264.7 stimulés avec le LPS. Les extraits de tiges et de fleurs de *S. canadensis* ont inhibé significativement la production de NO (45 à 65 %). Cette première partie du projet a permis de démontrer l'activité anti-inflammatoire de la plante. Le deuxième objectif était d'identifier les composés responsables de l'activité. L'extrait de fleurs étant plus actif que l'extrait de tiges, nous avons donc poursuivi nos travaux d'identification avec cet extrait. L'extrait de fleurs brut a été fractionné par extraction liquide-liquide. L'activité anti-inflammatoire des deux fractions obtenues (EtOAc et eau) a été évaluée. La fraction EtOAc a été trouvée toxique et inactive, alors que la fraction eau s'est avérée non toxique et active avec une inhibition de NO d'environ 35 % à une concentration de 12 µg/ml (Figure 1).

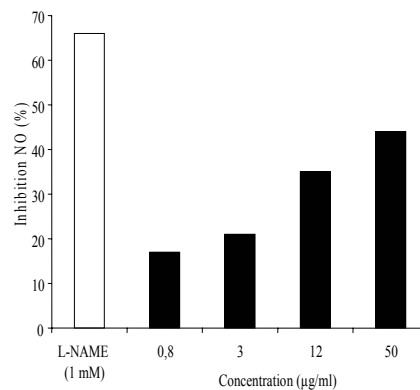


Figure 1 : Inhibition de la production de NO par la fraction eau de fleurs du *Solidago canadensis*

La fraction eau a ensuite été séparée par HPLC préparatif afin d'isoler les composés majoritaires. Nous avons isolé et identifié cinq composés: 1) l'acide néochlorogénique ; 2) l'acide chlorogénique ; 3) l'acide 4,5-dicaffeoylquinic; 4) l'acide 3,5-dicaffeoylquinic et 5) l'acide 3,4-caffeoylquinic. Une activité anti-inflammatoire modérée a été observée pour l'acide chlorogénique (Figure 2). L'acide 4,5-dicaffeoylquinic, l'acide 3,5-dicaffeoylquinic et l'acide 3,4-caffeoylquinic se sont révélés inactifs. Un article sera soumis au journal *Phytotherapy research*¹⁰.

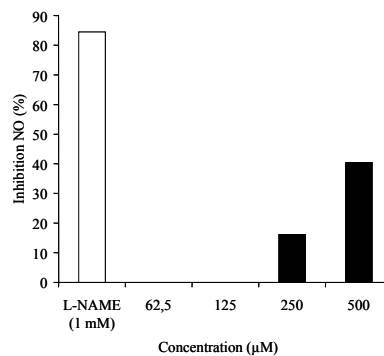


Figure 2 : Inhibition de la production de NO par l'acide chlorogénique.

4.2 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *L. groenlandicum* et isolation de composés bioactifs.

Le *Ledum groenlandicum* (Thé du Labrador) est une espèce d'éricacée largement distribuée en Amérique du Nord. Les feuilles et la tige de cette plante étaient utilisées dans la médecine traditionnelle amérindienne pour traiter diverses pathologies impliquant l'inflammation telles que l'asthme, les rhumatismes et les brûlures. Les principaux objectifs de cette partie du projet visaient à évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire, et à identifier le ou les composés responsables de la bioactivité. Une macération dans le méthanol des feuilles et des tiges a été effectuée afin d'extraire les composés potentiellement actifs. L'activité antioxydante des deux extraits méthanoliques a été évaluée à l'aide de la méthode ORAC. Les résultats obtenus montrent que les feuilles et les tiges possèdent une forte activité antioxydante avec des valeurs ORAC respectives de 16 ± 2 et 20 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$. Un test sur cellule confirme ce résultat avec une inhibition de l'oxydation du DCFH induite par le tBH de 73 % pour les feuilles et de 78 % pour les branches à une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages de Raw264.7 stimulés au LPS. L'inhibition était de 28 % pour les tiges et de 17 % pour les feuilles à une concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 3). Ce résultat est comparable à l'inhibition de 24 % induit par le L-NAME. Nous avons isolé un des composés majoritaires présent dans les tiges, l'acide ursolique. Plusieurs groupes de recherche ont démontré que l'acide ursolique possède des propriétés anti-inflammatoires. En effet, il inhiberait iNOS et COX2. Nos résultats ont été publiés en 2007 dans *Journal of Ethnopharmacology*¹¹.

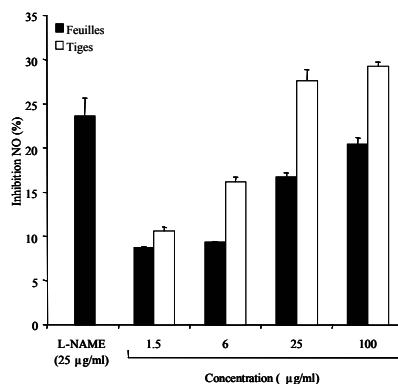


Figure 3 : Effet d'extraits méthanoliques de *L. groenlandicum* sur la production d'oxyde nitrique NO induit dans des macrophages murins RAW 264.7 stimulés avec le LPS.

4.3 Isolation et identification d'un composé anti-inflammatoire dans les feuilles de *B. Schreberi* et évaluation du mécanisme d'action.

La Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi* Gmel) est une plante aquatique que l'on retrouve en Asie, en Afrique, en Amérique central et en Amérique du Nord (forêt boréale). Au Japon, les feuilles de cette plante sont très appréciées en salade. On lui reconnaît des vertus anticancéreuses. De plus, cette plante était utilisée pour traiter les abcès, les furoncles, la dysenterie et la tuberculose. Les principaux objectifs de cette étude visaient: i) à évaluer l'activité antioxydante d'extraits de feuilles de brasénie ; ii) à isoler et identifier le ou les composés responsables ; et iii) à tester l'activité anti-inflammatoire. Le potentiel antioxydant de trois extraits (dichlorométhane, méthanol et eau) a été évalué à l'aide de la méthode ORAC. Les extraits méthanoliques et aqueux ont été trouvés actifs avec une valeur ORAC respectives de 7 ± 2 et 5.1 ± 0.5 $\mu\text{mol TE/mg}$. Le composé majoritaire de l'extrait méthanolique a été identifié comme étant la quercetin-7-O- β -glucopyranoside (querciméritrine), alors que le composé majoritaire de l'extrait aqueux était l'acide gallique. Les deux composés possèdent une forte activité antioxydante, en particulier la querciméritrine avec une valeur ORAC de 18 ± 4 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$. Au contraire, de son homologue bien connu, la quercétine, le

glycoside est plus soluble en milieu aqueux et il n'inhibe pas la croissance des macrophages Raw264.7 (Figure 4A). L'activité anti-inflammatoire de la querciméritrine a été évaluée et les résultats montrent que ce composé inhibe la production de NO dans les macrophages Raw264.7 stimulées au LPS ou l'INF- γ (Figure 4B). Les résultats de ces travaux ont été soumis à Phytotherapy Research. Une étude visant à étudier le mécanisme d'action anti-inflammatoire de la querciméritrine a été réalisée. Les résultats obtenus à l'aide de gel de protéine montrent que celle-ci inhibe iNOS et COX2 après stimulation des macrophages Raw264.7 avec le LPS ou l'INF- γ . Ces travaux font l'objet d'une publication soumise à Phytotherapy Research¹².

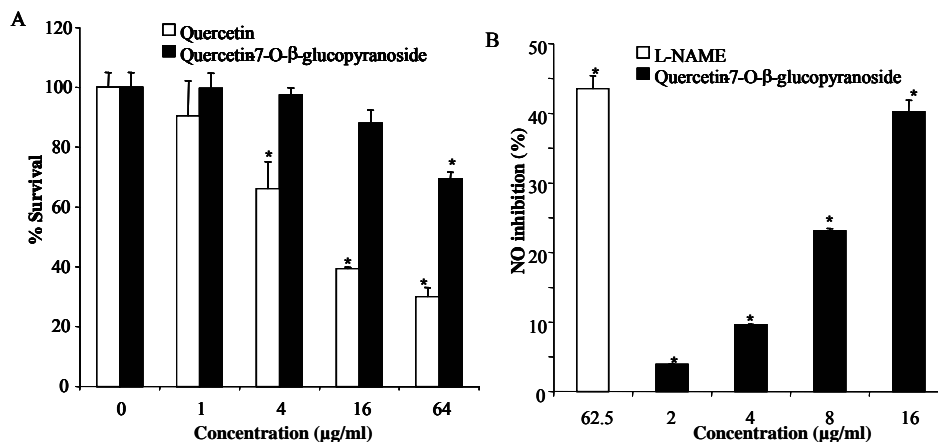


Figure 4 : Effet cytotoxique de la quercétin et de la querciméritrine (quercétin-7-O- β -glucopyranoside) sur les macrophages Raw264.7 (A) et activité anti-inflammatoire de la querciméritrine.

4.4 Évaluation et isolation de composés anti-inflammatoire dans les bourgeons de *Populus tremuloides*.

Les bourgeons de *Populus tremuloide* ont été récoltés et les composés ont été obtenus par extraction avec le méthanol. L'extrait méthanolique des bourgeons (5 μ g/ml) a montré une activité anti-inflammatoire significative avec une inhibition d'environ 50% de la production de NO produit par des macrophages de souris Raw264.7 stimulés avec le LPS. Cet extrait n'est pas cytotoxique pour les cellules saines. L'isolation bioguidée des composés responsables de l'activité anti-inflammatoire a permis d'identifier 19 molécules dont plusieurs étaient bioactives. La lasiocarpin C était un des composés les plus actifs avec une inhibition d'environ 75% de la production de NO à une concentration de 2.5 μ g/ml.

4.5 Hémi-synthèse d'un composé anti-inflammatoire à partir de molécules isolées de *Betula papyrifera*.

Le *Betula papyrifera* était utilisé en médecine traditionnelle amérindienne pour soigner la douleur et l'inflammation. Un des composés responsables de cette activité est le salicylate, un ingrédient proche de l'aspirine. Ce composé se retrouve dans les feuilles, les bourgeons et les tiges. D'autre part, l'écorce externe de *Betula papyrifera* contient de l'acide bétulinique, un composé anticancéreux actif contre le mélanome. Cependant, les propriétés pharmacologiques de cette molécule, en particulier l'hydrosolubilité, doivent être améliorées pour développer un traitement plus efficace contre le cancer. Notre laboratoire a entrepris de synthétiser des dérivés plus solubles à partir de l'acide bétulinique. L'activité anti-inflammatoire de huit de ces dérivés a été évaluée sur les macrophages Raw264.7 stimulés avec le LPS. Un de ces composés, le bet-a, a inhibé la production de NO de 91 ± 13 % sans toxicité à une concentration de 40 μ M. Le bet-a est 25 fois plus actif que le témoin positif, L-NAME. Nous avons également démontré que le bet-a inhibe fortement l'induction de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS). Cette enzyme est responsable de la production de NO induite par le LPS.

5. APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS ET RETOMBÉES ESCOMPTÉES

Les résultats décrits dans ce projet de recherche permettront de valoriser plusieurs biomasses de la forêt boréale par des utilisations fines pour traiter des pathologies inflammatoires. En effet, nous avons identifié plusieurs plantes ayant des propriétés anti-inflammatoires intéressantes. De plus, quelques composés responsables de l'activité ont également été caractérisés. 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. 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. En effet, plusieurs étudiants à la maîtrise ont été formés dans un domaine de recherche important pour le développement scientifique et économique du Saguenay–Lac-St-Jean. Les jeunes chercheurs ont acquis des compétences en chimie et en pharmacologie des produits d'origine naturelle. Des études supplémentaires devront être menées afin de compléter le développement pharmaceutique et nutraceutique des extraits et composés prometteurs.

6. BIBLIOGRAPHIE

- ¹Harvey, A. (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*. 5: 294-300.
- ²Moerman, D.E. (1998). *Native American ethnobotany*. Ed. Timber Press Inc. 927 pages
- ³Statistique canadienne. État de santé. http://www.statcan.ca/francais/Pgdb/health_f.htm
- ⁴Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November (1986). *Am Rev Respir Dis* 136: 225-44..
- ⁵Lemanske RF, Jr., Busse WW. (2003). 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 111(2 Suppl):S502-S519.
- ⁶Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M et al. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*; 111: 1293-8.
- ⁷Hamid Q, Tulic M.K., Liu M.C., Moqbel R. (2003). Inflammatory cells in asthma: Mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol*; 111: S5-17).
- ⁸Ju, HK, Baek, S-H, An, R-B, Bae, K, Son, KH, Kim, HP, Kang, SS, Lee, SH, Son, JK et Chang, W. (2003). Inhibitory effects of nardostachin on nitric oxide, prostaglandin E2, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide activated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 26 : 1375-1378
- ⁹Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology* 1: 1397-1406
- ¹⁰Dufour D., Pichette A., Mshvildadze V., Bradette-Hébert M.-E., Lavoie S., Longtin A., Laprise C. and Legault J. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 22-8.
- ¹¹Bradette-Hébert M.-E., Pichette A., Mshvildadze V., Laprise C. and Legault J. (2008). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Solidago canadensis* flowers. *Phytotherapy Research*.
- ¹²Perron T., Pichette A., Girard-Lalancette K., Longtin A., Sirois P. and Legault J. (2008). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Quercetin 7-O- β -glucopyranoside from the Leaves of a Fresh Water Plant, *Brasenia schreberi*. *Phytotherapy Research*.