

POTENTIEL DE VALORISATION D'ÉCORCES D'ESSENCES DES FORÊTS CHAMPARDENNAISES

Pierre Darme^{1,3,2}, Jérémy Spalenka^{3*}, Julien Cordonnier^{1,3}, Simon Remy¹, Sandie Escotte-Binet³, Stéphanie Baud^{5,7}, Manuel Dauchez^{5,7}, Isabelle Villena⁴, Sophie Gangloff⁶, Fany Reffuveille⁶, Marius Colin⁶, Dominique Aubert⁴, Jean-Marc Nuzillard¹, Laurence Voutquenne-Nazabadioko¹, Jane Hubert², Jean-Hugues Renault¹

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS, ICMR, Reims, France

² NatExplore SAS, Reims, France

³ Université de Reims Champagne-Ardenne, ESCAPE, Reims, France

⁴ Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims, ESCAPE, Reims, France

⁵ Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS, MEDyC, Reims, France

⁶ Université de Reims Champagne-Ardenne, BIOS, Reims, France

⁷ Université de Reims Champagne-Ardenne, Plateau de Modélisation

Moléculaire Multiéchelle P3M, Reims, France

* Current adress: CepSup, Reims, France

Résumé

Les écorces constituent un des coproduits les plus abondants de l'industrie sylvicole. Elles sont actuellement recyclées pour des applications à faible valeur ajoutée, voire considérées comme des déchets ultimes. Néanmoins plusieurs substances naturelles initialement extraites d'écorces sont devenues des substances actives essentielles de la pharmacopée occidentale et les décoctions intégrant des écorces sont nombreuses à être employées en médecine traditionnelle. Les résultats de l'évaluation biologique d'une échantillothèque d'extraits d'écorces d'essences champardennaises permettent ici de démontrer l'immense potentiel de ces co-produits dans des domaines à haute valeur ajoutée telles que les industries cosmétique (propriétés dermocosmétiques) et pharmaceutique (agents antibactérien, antiparasitaire).

Mots-clés

Écorces, chimie du végétal, antibactérien, antiparasitaire, cosmétique, dérégulation, chromatographie de partage centrifuge, *docking* inverse.

Abstract

Barks are one of the most abundant co-products of the forest industry. They are currently recycled for applications with low added value, or even considered as final waste. Nevertheless, several natural products initially extracted from barks became essential active substances in the Western pharmacopeia and many decoctions incorporating barks are used in traditional medicine. Results obtained from the biological evaluation of a bark extract collection collected in Champagne-Ardenne forests demonstrate here the great potential of these co-products as antibacterial, antiparasitic, or dermo-cosmetic active ingredients for applications in high value-added sectors such as the cosmetics or pharmaceutical industries.

Keywords

Barks, bio-based chemistry, antibiotic, antiparasitic, cosmetic, dereplication, centrifugal partition chromatography, inverse docking.

Les substances naturelles organiques de faible masse moléculaire sont produites par les êtres vivants afin d'assurer leurs besoins fonctionnels et désignés sous l'appellation générale de métabolites. Les métabolites primaires sont impliqués dans les voies biochimiques vitales et les métabolites secondaires, ou spécialisés, sont les médiateurs de l'interaction des organismes vivants avec leur environnement biotique et abiotique. Les expressions « produit naturel » et « substance naturelle » désignent généralement un métabolite secondaire ou spécialisé.

L'utilisation de plantes à des fins thérapeutiques a toujours été une composante des comportements humains et animaux. Au-delà de leurs usages dans les médecines traditionnelles, les substances naturelles constituent encore de nos jours une source importante d'inspiration pour la médecine occidentale. Ainsi, nombreuses sont les substances actives commercialisées qui ont une origine naturelle. Parmi les plus connues, il est possible de citer l'artémisinine issue d'*Artemisia annua* et la quinine de *Cinchona officinalis* actives contre le paludisme, ou le taxol et la vinblastine extraits respectivement de *Taxus baccata* et de *Catharanthus roseus* pour lutter contre certains cancers ou encore l'acide acétylsalicylique, dérivé de l'acide salicylique produit notamment par les plantes du genre *Salix* et utilisé depuis plus de 3 millénaires comme fébrifuge et anti-inflammatoire. On remarquera que plusieurs des composés cités (l'artémisinine, la quinine, le taxol, l'acide salicylique) ont été initialement extraits d'écorces, ce tissu correspondant au revêtement extérieur des plantes ligneuses et assurant une fonction protectrice pour les tissus sous-jacents tels que le cambium et le bois. Il n'est donc pas étonnant d'y trouver des composés connus pour contribuer à l'arsenal de défense des plantes ligneuses vis-à-vis d'agressions extérieures.

Un recensement des substances naturelles introduites comme médicaments entre 1981 et 2019 a été réalisé par Newman et Cragg[1]. Parmi les 1881 molécules mises sur le marché durant ces 39 années, 71 sont des substances naturelles *stricto sensu*, 356 sont des dérivés de substances naturelles, souvent obtenus par hémisynthèse et 272 sont obtenues par synthèse organique tout en ayant un pharmacophore inspiré de substances naturelles. Dans le domaine des substances antiparasitaires, 20 nouveaux médicaments ont été approuvés durant la même période, 2 étant des produits naturels, 7 des composés dérivés de produits naturels et 3 étant issus de la synthèse organique tout en présentant un pharmacophore naturel. Pour ce qui est des antibactériens, sur 162 nouvelles molécules, 11 sont des substances naturelles, 78 sont dérivées de substances naturelles et 4 sont des composés de synthèse ayant un pharmacophore inspiré de substances naturelles. Ces données confirment l'importance des produits naturels comme source de substances actives.

Les écorces de tronc constituent les principaux résidus issus des activités forestières. Actuellement, ces écorces sont principalement recyclées comme combustible ou matériau d'isolation, utilisées en horticulture comme paillage ou simplement éliminées comme déchets ultimes. Cependant, au cours des dernières années, un nombre croissant d'études a mis en évidence la diversité des

composés biologiquement actifs qui peuvent être extraits des écorces et valorisés dans des secteurs à haute valeur ajoutée[2]-[5]. A titre d'exemple, des propriétés antiparasitaires significatives ont été récemment rapportées pour différentes écorces d'Afrique centrale[6], [7]. Dans les régions plus septentrionales, divers extraits d'écorces d'essences européennes ont démontré un large éventail de propriétés pharmacologiques, dont des activités anticancéreuse, antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique ou encore antipyrétique[8]-[10].

Par ailleurs, des recherches dans le domaine de la zoopharmacognosie¹ rapportent également l'utilisation des écorces par certains animaux comme source de métabolites à usage thérapeutique. Ainsi, il a été rapporté qu'une femelle chimpanzé atteinte de troubles digestifs avait intentionnellement mâché des écorces d'*Albizia grandibracteata*, ce qui permit après deux jours, de diminuer drastiquement la charge virale diagnostiquée précédemment [11]. Le potentiel de valorisation d'écorces d'arbres présents dans les forêts tempérées du Grand-Est sera présenté dans la suite de cet article au travers de la présentation de travaux réalisés à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Évaluation biologique d'une bibliothèque d'extraits d'écorces d'essences des forêts champardennaises

Dans le cadre de travaux de recherche menés à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, une bibliothèque d'extraits a été constituée à partir des écorces de dix essences fréquemment retrouvées dans les forêts tempérées du Grand-Est : *Fagus sylvatica* (hêtre commun), *Quercus robur* (chêne pédonculé), *Alnus glutinosa* (aulne glutineux), *Prunus avium* (merisier), *Acer pseudoplatanus* (érable sycomore), *Fraxinus excelsior* (frêne élevé), *Populus robusta* (peuplier euraméricain), *Larix decidua* (mélèze d'Europe), *Picea abies* (épicéa commun), et *Populus tremula* (tremble d'Europe). Pour chaque essence, trois extraits de polarité croissante ont été préparés par extraction solide-liquide avec le *n*-heptane, le méthanol puis un mélange de méthanol et d'eau.

Le potentiel des trente extraits obtenus a été évalué pour des applications en dermocosmétique via plusieurs tests génériques tels que la capacité à piéger les radicaux libres, à inhiber l'élastase, la collagénase ou la tyrosinase ou encore la mesure du potentiel antibactérien contre *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Parallèlement, les profils moléculaires globaux de tous les extraits ont été établis par RMN 1D et 2D puis reliés à leurs activités biologiques[12]. Les résultats ont montré que les extraits méthanoliques de chêne pédonculé (*Q. robur*) - riche en acide ellagique, de *A. glutinosa* - riche en orégonine, de mélèze d'Europe (*L. decidua*) - riche en di- et sesquiterpènes et d'épicéa commun (*P. abies*) - riche en (*E*)-astringine présentent des activités particulièrement élevées dans la plupart des tests biologiques, suggérant des applications prometteuses.

¹ Processus par lequel certains animaux et particulièrement les primates s'auto-soignent au moyen de plantes, terre ou insectes pour traiter ou prévenir des maladies

Afin de compléter les résultats préliminaires obtenus sur *S. aureus*, une campagne plus approfondie de tests antimicrobiens a été réalisée sur dix-sept souches bactériennes Gram positives et Gram négatives et cinq souches de levures à partir des dix extraits méthanoliques d'écorces[13]. Comme le montre le tableau 1, trois extraits ont montré des activités significatives contre différentes bactéries à Gram positif ou négatif ainsi que contre plusieurs levures. Il s'agit des extraits d'écorces de chêne pédonculé (*Q. robur*), d'aulne glutineux (*A. glutinosa*) et de merisier (*P. avium*).

Tableau 1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits méthanoliques de 10 écorces contre 17 souches bactériennes et 5 souches de levures

Micro-organisme	CMI (mg/mL)										Contrôles positifs			
	Hêtre	Chêne	Aulne	Merisier	Erable	Frêne	Peuplier	Méleze	Epicéa	Tremble	G	V	A	
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>	5	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	5	1.2	2.5	1.2	1.2	2.5	S	S	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	10	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	NA	5	5	1.2	2.5	5	R	R	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	0.6	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	NA	2.5	2.5	≤ 0.3	1.2	5	S	S	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	NA	1.2	2.5	1.2	2.5	2.5	S	S	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.6	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	10	1.2	2.5	≤ 0.3	≤ 0.3	1.2	S	S	NT
	<i>Listeria innocua</i>	5	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	5	2.5	5	1.2	1.2	2.5	S	S	NT
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	5	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	S	S	NT
	<i>Micrococcus luteus</i>	1.2	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	5	2.5	2.5	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5	S	S	NT
	Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	NA	2.5	0.6	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>		NA	2.5	0.6	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Salmonella enterica</i>		NA	1.2	0.6	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Serratia marcescens</i>		NA	1.2	≤ 0.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Proteus vulgaris</i>		NA	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		NA	2.5	0.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	R	R	NT
<i>Providencia stuartii</i>		NA	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		NA	≤ 0.3	≤ 0.3	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	R	NT
<i>Shigella sonnei</i>		0.6	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	10	1.2	2.5	≤ 0.3	0.6	1.2	S	I	NT
Levure	<i>Candida glabrata</i>	NA	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	NA	NA	NA	10	NA	NA	R	R	S
	<i>Candida tropicalis</i>	NA	≤ 0.3	0.6	≤ 0.3	NA	NA	NA	≤ 0.3	NA	NA	R	R	S
	<i>Candida kefyr</i>	NA	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	R	R	S
	<i>Candida albicans</i>	NA	≤ 0.3	0.6	≤ 0.3	NA	NA	NA	≤ 0.3	NA	NA	R	R	S
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2.5	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5	NA	NA	NA	NA	NA	R	R	S

NT : Non testé; NA : Sans activité; S : Sensible; I : Intermédiaire; R : Résistant.
 CMI (µg/mL) des contrôles positifs : Gentamicine, S : ≤4, R : >8; Vancomycine, S : ≤4, R : >16; Amphotéricine B, S : ≤1, R : >4. Fond vert : CMI < 0,3 mg/mL; Fond jaune : 0,3 mg/mL < CMI < 10 mg/mL; Fond rose : 10 mg/mL < CMI.

Enfin, les activités antiparasitaires contre *Toxoplasma gondii* des trente extraits d'écorces (dix essences, trois extraits solide-liquide par essence) ont été évaluées. *T. gondii* est le parasite responsable de la toxoplasmose. Il appartient au phylum des Apicomplexa caractérisé par une phase de réplication intracellulaire. Cette parasitose touche près d'un tiers de la population mondiale[14] et l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) indique qu'environ 50 % de la population adulte française serait infectée[15]. La toxoplasmose est d'ordinaire bénigne mais peut présenter des risques pour le fœtus chez la femme enceinte non immunisée qui la contracte pendant la grossesse (toxoplasmose congénitale dont 80 % des cas sont asymptomatiques à la naissance) et chez les personnes immunodéprimées, leur système immunitaire ne pouvant pas se défendre contre le parasite en cas de chimiothérapie ou d'infection par le virus du SIDA [16]. Par ailleurs, aux Etats-Unis, une étude de 1999 indiquait qu'il s'agissait de la troisième cause de décès d'origine alimentaire après les infections causées par les bactéries du genre *Salmonella* et *Listeria*[17]. L'étude du potentiel antiparasitaire de ces extraits d'écorces a consisté en la détermination de la chimiosensibilité à 100 µg/mL du tachyzoïte de *T. gondii* et de la cytotoxicité sur cellules Vero pour calculer un indice de sélectivité. Un indice de sélectivité supérieur à 4 indique que l'extrait a une activité antiparasitaire spécifique en tenant compte de la toxicité pour la cellule hôte. Les extraits obtenus dans le *n*-heptane de l'aulne glutineux (*A. glutinosa*) et du mélèze d'Europe (*L. decidua*) ont montré les meilleurs résultats, avec une inhibition de la multiplication parasitaire respectivement de 85 % et 58 % (Figure 1) sans cytotoxicité significative (données non présentées).

Ces premiers résultats montrent le potentiel de valorisation des écorces d'arbres retrouvés communément dans nos forêts tempérées dans des domaines à haute valeur ajoutée et ont suscité des études complémentaires afin notamment de relier les activités biologiques des extraits complexes à la présence d'une ou plusieurs substances naturelles.

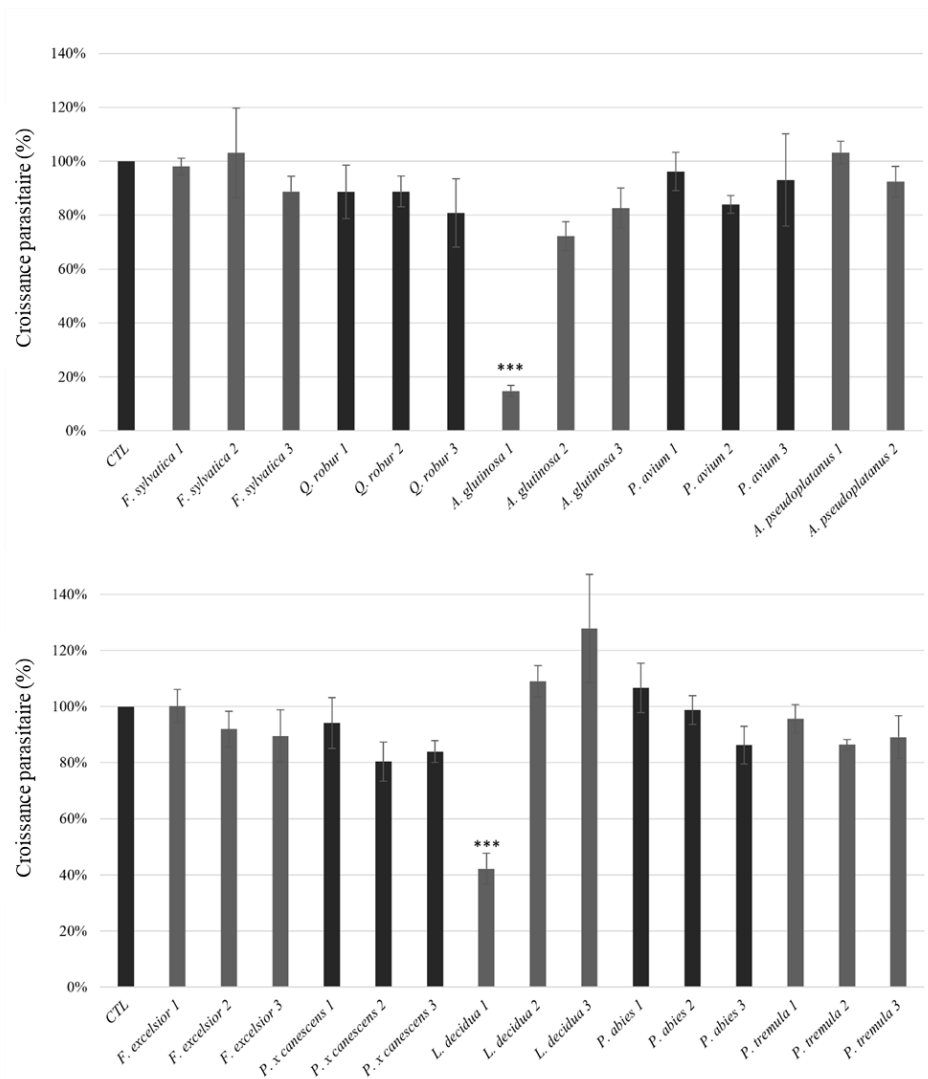


Figure 1 : Criblage *in vitro* des extraits d'écorce sur *T. gondii* à 100 µg/mL. Croissance parasitaire après 72 h d'incubation. Chaque graphe montre la croissance du tachyzoïte comparée au contrôle positif. Les nombres 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux extraits *n*-heptane, méthanol et méthanol/eau.

Pistes de valorisation des extractibles d'écorces d'épicéa commun (*Picea abies*) en dermo-cosmétique

Les études préliminaires présentées ci-dessus ont mis en évidence que l'extrait méthanolique d'écorces de *P. abies* présentait des activités antimicrobienne, antiradicalaire, antiélastase et anticollagénase recherchées par l'industrie dermocosmétique[12]. Afin d'identifier la ou les molécules responsables de ces activités, un fractionnement original par chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été réalisé [18]. La CPC est une technique de séparation multi-étagée, utilisant des colonnes compactes, constituées d'une cascade de chambres ou cellules de partage reliées entre elles par des canaux et soumises à un champ d'accélération centrifuge. Le mécanisme de séparation repose sur la différence de distribution des composés entre deux phases liquides non miscibles proches de leur équilibre thermodynamique. Un des liquides est maintenu stationnaire grâce à la rotation de la colonne et donc sans avoir recours à un support chromatographique solide, tandis que la phase mobile traverse la phase stationnaire à un débit imposé par une pompe. L'absence de support chromatographique solide permet d'aborder la

purification d'échantillons complexes, comme c'est souvent le cas pour les substances naturelles issues de biomasses diverses, sans risquer la surcharge ou l'encrassement du support (résine, silice) ou encore la dégradation de certains solutés, tout en permettant d'atteindre des taux de recouvrement proches de 100 % (pas de perte de matière). Dans le cas présent, un procédé original reposant sur l'utilisation d'un système triphasique quaternaire composé de *n*-heptane, d'éther de méthyle et de *tert*-butyle, d'acétonitrile et d'eau a été développé afin de séparer efficacement les tanins des autres métabolites - les tanins étant connus pour perturber de nombreux tests biologiques en favorisant la précipitation des protéines. Les fractions chimiquement simplifiées obtenues après fractionnement par CPC ont ensuite été soumises à une étape de déréplication. Cette étape du profilage chimique, consiste à annoter les molécules connues dans un mélange complexe.

La déréplication, concept introduit en 1990 par Beutler et al.*, consiste à identifier le plus tôt possible, dans un mélange complexe (généralement un extrait naturel), la présence de composés connus avant même leur isolement physique qui est souvent long, fastidieux et coûteux. Il s'agit donc d'éviter de « répliquer » un travail déjà effectué par d'autres. Cela implique l'utilisation de techniques spectroscopiques le plus souvent combinées à des méthodes séparatives afin de produire des jeux de données pour annoter - via l'interrogation de bases de données expérimentales ou produites *in silico* - les composés ou familles de composés présents dans les extraits étudiés. Les méthodes de déréplication permettent donc principalement i) l'annotation rapide de composés connus dans des mélanges chimiquement complexes, ii) la détermination de composés impliqués dans une activité biologique, iii) la recherche ciblée de composés ou familles de composés souhaitées ou indésirables en fonction de l'application ciblée et enfin indirectement iv) l'accélération du processus d'identification de composés nouveaux.

*Beutler JA, Alvarado AB, Schaufelberger DE, Andrews P, McCloud TG (1990) Dereplication of phorbol bioactives - *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. *J. Nat. Prod.* 53(4): 867-874.

Dans le cadre de cette étude, la déréplication repose sur le traitement par classification hiérarchique ascendante (CHA) des données de RMN du ¹³C enregistrées puis alignées pour la série de fractions. Plus précisément, les spectres sont enregistrés sur une fenêtre de déplacements chimiques de 240 ppm de large puis sont soumis à une recherche automatisée des pics. Les valeurs d'intensité des pics sont « stockées » dans des fenêtres de déplacement chimique de 0,2 ppm de large, de sorte que chacune corresponde à une valeur de déplacement chimique. Les fenêtres qui sont vides sur l'ensemble de la série de fractions sont supprimées de la liste des fenêtres qui apportent une information utile. Le contenu des fenêtres restantes permet de remplir une matrice à deux dimensions où chaque ligne correspond à une fenêtre de déplacement chimique ici de 0,2 ppm et chaque colonne à une fraction issue du fractionnement par CPC. Chaque cellule du tableau contient la valeur d'intensité spectrale correspondant à son déplacement chimique et à la référence de sa fraction de CPC. La CHA est alors effectuée sur les lignes de la matrice et permet de les regrouper par similarité du profil chromatographique. La résultante est la constitution de clusters de déplacement chimiques sur la base de la variation synchrone

d'intensité des signaux de ^{13}C au cours de fractionnement par CPC. Les clusters de déplacements chimiques sont ensuite utilisés pour interroger une base de données associant structures chimiques connues et déplacements chimiques de RMN du ^{13}C prédits[19]. Les annotations obtenues par cette méthode sont alors confirmées et transformées en identifications par l'analyse des spectres de RMN 2D des fractions où des corrélations caractéristiques pour chacune des structures proposées sont mises en évidence. Cette procédure de déréplication, développée à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims - UMR CNRS 7312, est appelée CaraMel, pour Caractérisation des Mélanges. La figure 2 présente la carte de chaleur obtenue après CHA ainsi que les structures chimiques des composés majoritaires annotés et identifiés dans l'extrait d'écorces de *Picea abies*.

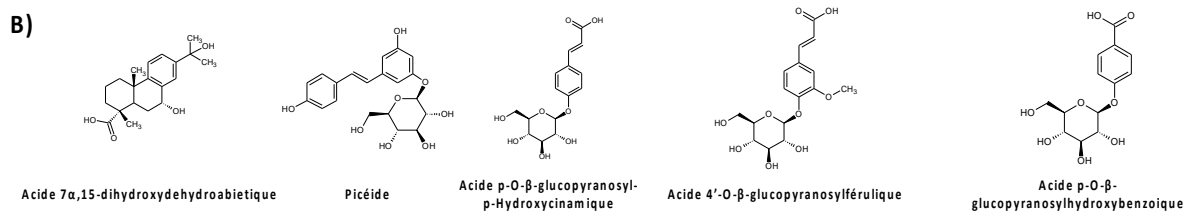
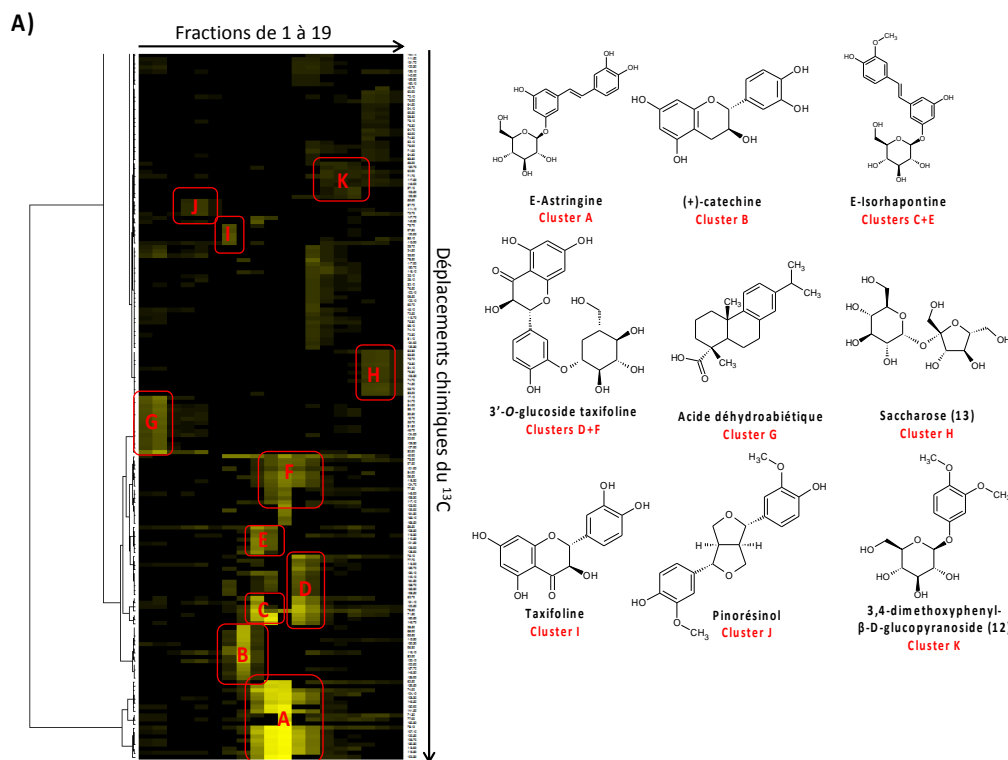


Figure 2. A) Carte de chaleur obtenue après classification hiérarchique ascendante. En colonnes : fractions de CPC ; en lignes : fenêtres de 0,2 ppm pour lesquelles un pic a été détecté dans au moins une des fractions de CPC. Identification directe de 9 composés majoritaires par l'analyse des déplacements chimiques des clusters issus du fractionnement par CPC de l'extrait méthanolique d'écorce de *P. abies* et confirmation par analyse des spectres de RMN 2D. B) Structure chimique des 5 composés minoritaires supplémentaires identifiés par interprétation des données RMN 2D.

A la suite de l'évaluation biologique des fractions issues de l'étape de CPC, cinq composés purifiés ont été testés pour leurs activités antimicrobienne, antiradicalaire, antiélastase et anticollagénase. Sans surprise, toutes les fractions contenant des composés phénoliques ont montré une activité d'inhibition significative du radical DPPH $^{\bullet}$, les fractions riches en tanins étant les plus actives. Concernant l'activité dépigmentante (inhibition de la tyrosinase), les fractions riches en tanins se sont également révélées actives, tout comme la taxifoline (43,4 % d'inhibition à 30 μM), le *E*-picéide (40 % d'inhibition à 10 μM), et dans une moindre mesure le dérivé 3'-O- β -D-glucopyranoside de la taxifoline. La *E*-astringine quant à elle présente un effet inducteur en augmentant l'activité de la tyrosinase. Elle a également montré une importante activité anti-collagénase (valeur CI_{50} de 258,7 μM) ainsi qu'une activité antimicrobienne significative contre *Enterococcus faecalis* (CMI de 31,2 $\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus epidermidis* (CMI de 31,2 $\mu\text{g/mL}$), *S. aureus* (CMI de 62,5 $\mu\text{g/mL}$) et *Pseudomonas aeruginosa* (CMI de 62,5

$\mu\text{g/mL}$). La taxifoline et son dérivé 3'-O- β -D-glucopyranoside ont également montré une activité anti-collagénase (CI_{50} de 193,3 μM et 141,4 μM respectivement) associée à une importante activité antibactérienne contre *S. aureus* (CMI de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ et 62,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivement). Ces résultats mettent en lumière un potentiel intéressant de valorisation d'extraits d'écorces d'épicéa commun pour les applications en dermocosmétique et/ou en tant qu'agent cicatrisant ou antibactérien.

Activité antibiotique des extractibles d'écorces de merisier (*Prunus avium*)

Les activités antibiotiques prometteuses de l'extrait méthanolique d'écorces de merisier nous ont conduit à entreprendre la même stratégie de fractionnement par CPC et de profilage chimique par la méthode CAMEL, c'est-à-dire sur la base des données de RMN du ^{13}C [20]. La figure 3 présente la carte de chaleur obtenue après CHA ainsi que les composés annotés. Les fractions riches en dihydrowogonine, une flavanone majoritaire de l'extrait, se sont révélées être les plus actives contre *S. aureus*, en provoquant chez cette bactérie une chute marquée de la croissance planctonique et une forte inhibition de la formation du biofilm. Ce dernier aspect revêt un intérêt tout particulier dans la mesure où la formation de biofilm fait partie de l'arsenal des bactéries pour lutter contre l'effet des antibiotiques. Aussi, la recherche de composés antibiofilm bactérien est devenue un axe de recherche important pour trouver de nouveaux agents antibactériens.

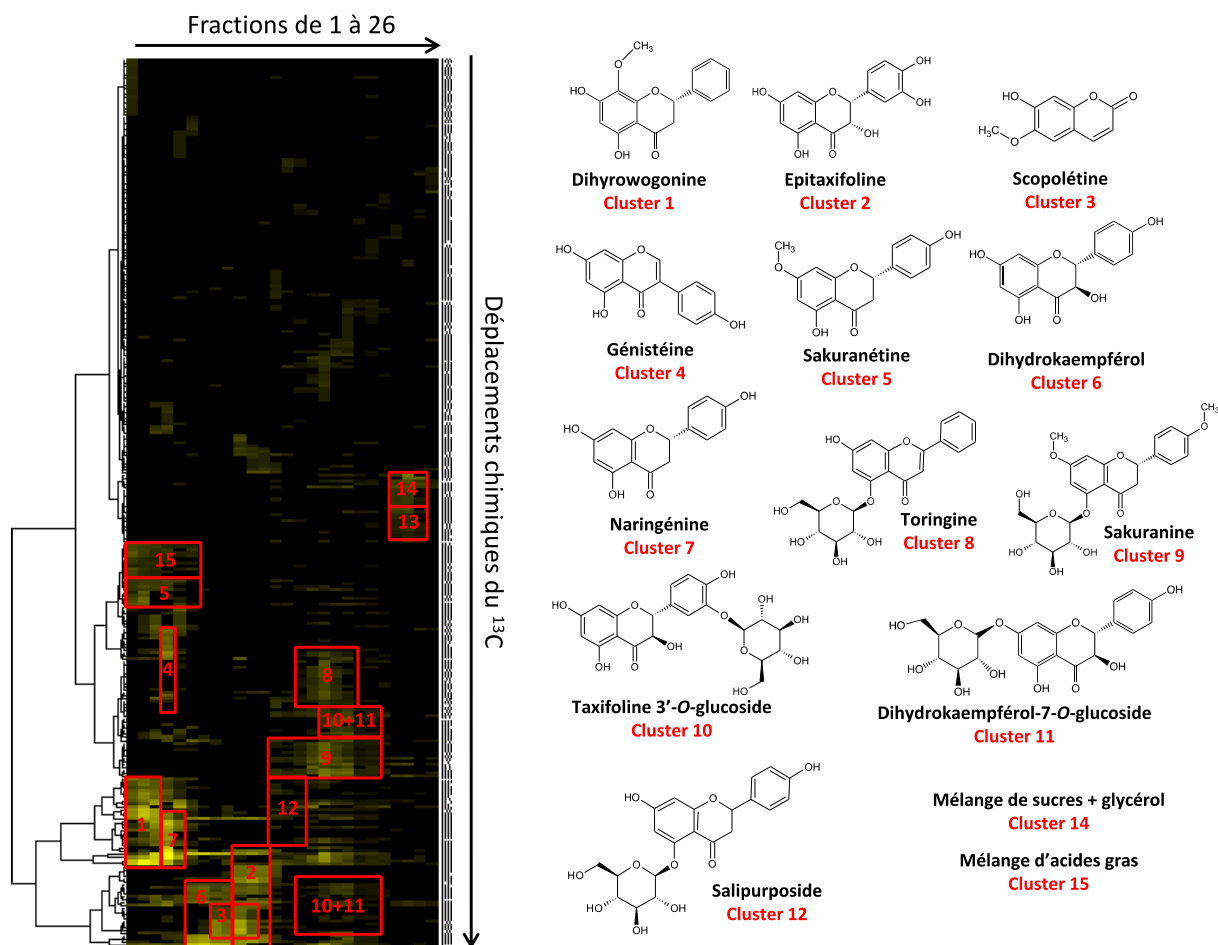


Figure 3. Classification hiérarchique ascendante des signaux RMN ^{13}C détectés dans toutes les fractions de CPC obtenues à partir de l'extrait méthanolique d'écorce de *P. avium* (merisier). En colonnes : fractions de CPC ; en lignes : fenêtres de 0,2 ppm pour lesquelles un pic a été détecté dans au moins une des fractions de CPC.

Activité antibiotique des extractibles d'écorces d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*)

De la même manière que pour le merisier, le potentiel antibiotique de l'extrait méthanolique d'aulne glutineux (*A. glutinosa*) a été évalué en détail afin d'identifier la ou les composés responsables de ladite activité. La figure 4 obtenue à la suite de la mise en œuvre de la stratégie CAMEL présente les composés majoritaires annotés, à savoir l'orégoneine, l'hirsutanonol, l'acide bétulinique et l'alnusénone. L'évaluation antibactérienne des fractions par bioautographie sur une souche de *S. aureus* a révélé que l'orégoneine, en plus d'être le métabolite majeur de l'extrait brut ($\approx 32\%$ en masse), était le composé le plus actif avec un effet inhibiteur antibactérien similaire à la gentamicine (un antibiotique de référence)[13]. Par la suite, la purification de l'orégoneine par CPC a été optimisée à l'échelle du laboratoire sur un équipement d'une capacité de 300 mL. Une injection de 3,7 g d'extrait méthanolique d'*A. glutinosa* a ainsi fourni 890 mg d'orégoneine avec une pureté de 94 % et un taux de récupération de 72 %. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour une production à plus grande échelle de l'orégoneine comme agent antimicrobien.

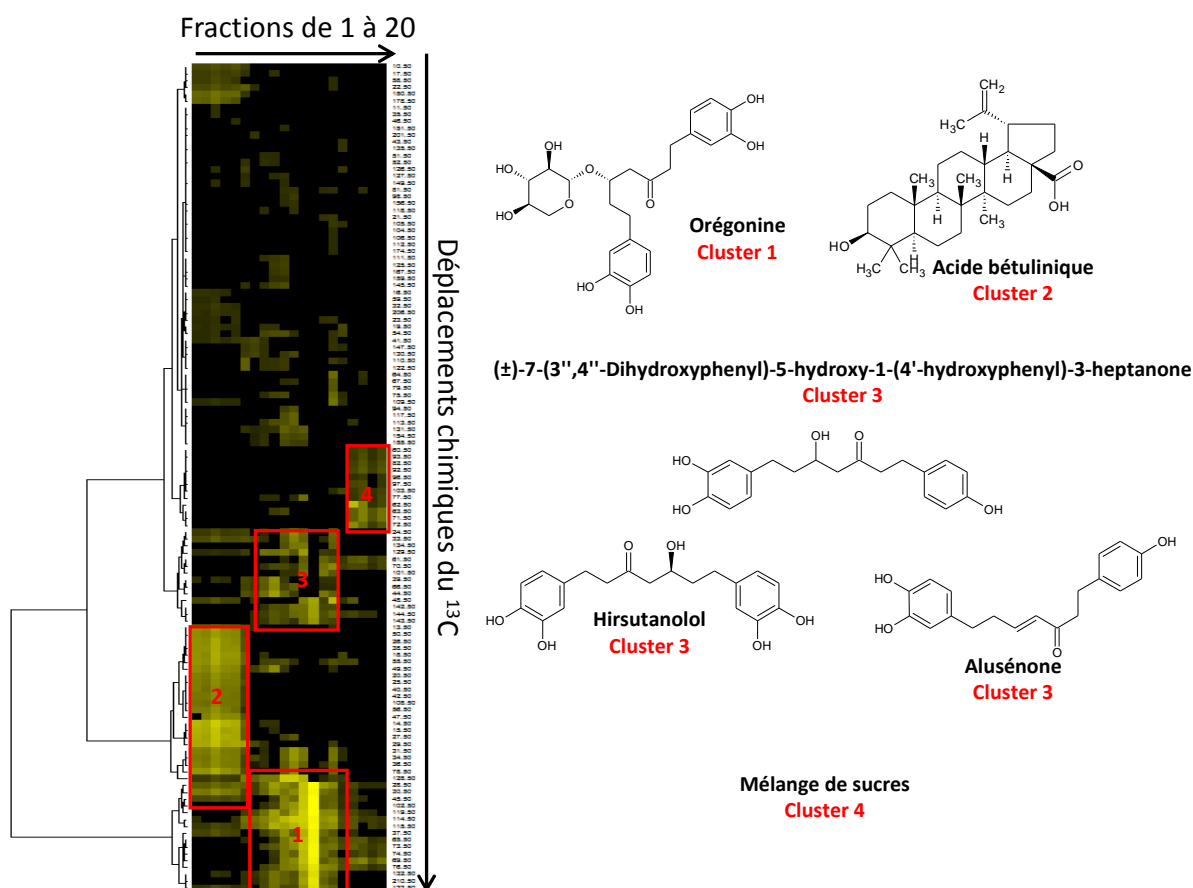


Figure 4. Classification hiérarchique ascendante des signaux RMN ^{13}C détectés dans toutes les fractions de CPC obtenues à partir de l'extrait méthanolique d'écorce d'*A. glutinosa* (aulne glutineux). En colonnes : fractions de CPC ; en lignes : fenêtres de 0,2 ppm pour lesquelles un pic a été détecté dans au moins une des fractions de CPC.

Des triterpènes extraits d'écorces d'essences champardennaises pour lutter contre *Toxoplasma gondii*.

Comme décrit plus haut, l'activité antiparasitaire de notre collection d'extraits d'écorces constituée à partir d'essences couramment retrouvées dans les forêts tempérées du Grand-Est a été étudiée *in vitro* contre l'infection par *Toxoplasma gondii*. Les résultats ont montré que l'extrait d'*Alnus glutinosa* obtenu dans le *n*-heptane présentait une activité antiparasitaire significative sans aucune cytotoxicité aux concentrations testées, avec une CI_{50} allant jusqu'à 25 $\mu\text{g/mL}$ et un indice de sélectivité supérieur à 4. Le profilage chimique de cet extrait par la méthode CAMEL après un fractionnement par CPC utilisant le système biphasique quaternaire *n*-heptane / acétate d'éthyle / méthanol / eau (9/1/9/1, v/v/v/v) a mis en évidence la présence de triterpènes à squelette lupane comme principaux constituants (figure 5). La capacité de la bétuline, de l'acide bétulinique et de la bétulone à inhiber la croissance de *T. gondii* a ensuite été évaluée et des taux d'inhibition de 44 %, de 50 % et de 99 % à 10 μM , respectivement, ont été mesurés. La bétulone, composé le plus intéressant, a révélé une CI_{50} de $2,7 \pm 1,2$

μM , une CC_{50} supérieure à 80 μM et un indice de sélectivité proche de 30. [21]

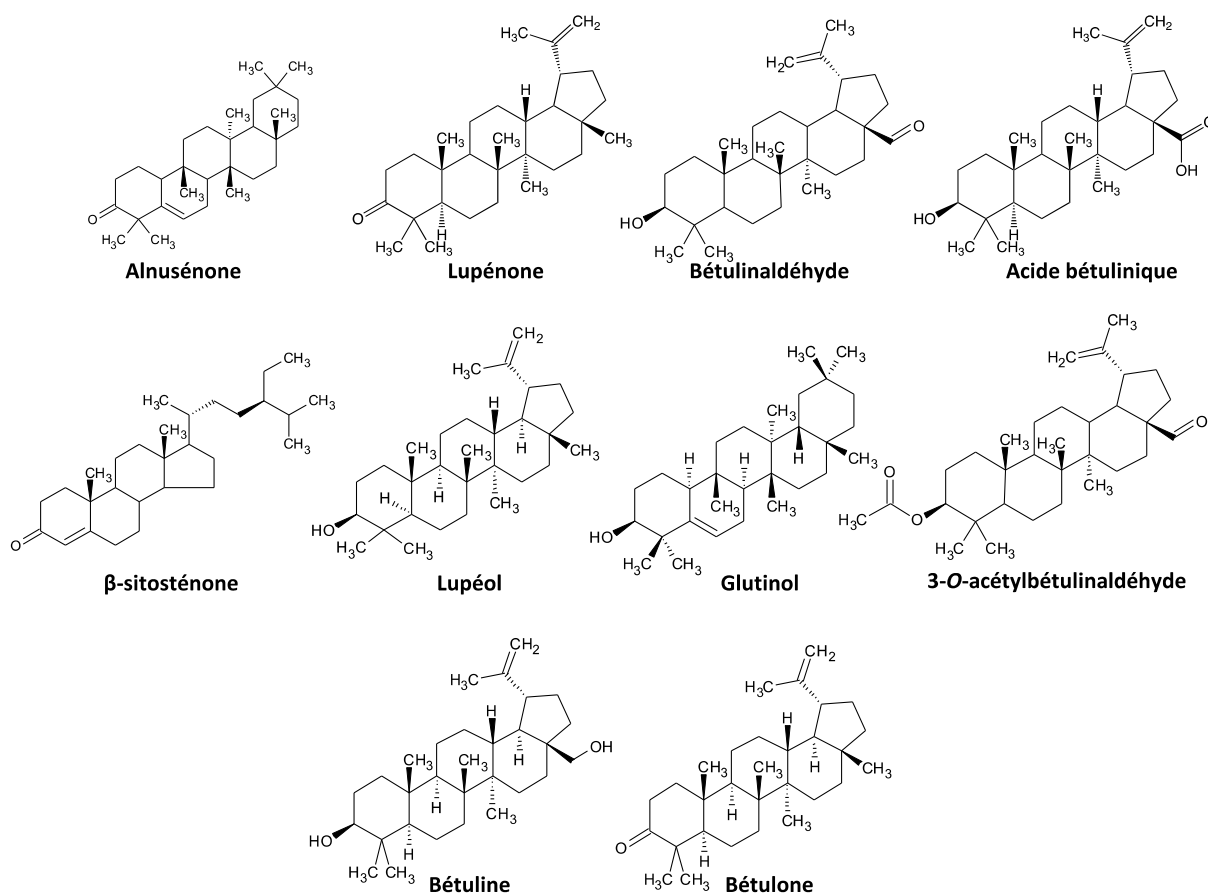


Figure 5. Composition chimique des fractions obtenues par CPC de l'extrait *n*-heptane d'écorce d'*A. glutinosa* (Aulne glutineux).

Une étude de relation structure-activité préliminaire suggère que la présence d'une fonction cétone en position C-3 ou d'un substituant carboxylique en C-17 sur le squelette lupane constituent des éléments structuraux importants à la fois pour l'activité contre le parasite et pour la sélectivité. Parmi les composés testés après purification, la bétulone présente l'activité la plus intéressante et constitue un point de départ prometteur pour le développement de nouveaux traitements de la toxoplasmosé.

A ce stade, des éléments de compréhension du mécanisme d'action de ces triterpènes ont été apportés par une approche *in silico*. Pour ce faire, un outil de *docking* inverse nommé AMIDE (pour *AutoMated Inverse Docking Engine*), développé initialement à l'Université de Reims Champagne-Ardenne par l'UMR 7369 MEDyC, en collaboration avec d'autres unités rémoises dont l'UMR 7312 ICMR, a été utilisé [22]. A l'inverse du *docking* classique, le *docking* inverse, consistant à cribler un ligand sur une bibliothèque de cibles protéiques, constitue un outil d'intérêt pour établir les premiers éléments qui permettront ensuite de guider les travaux des biologistes, travaux destinés à identifier les protéines impliquées dans le mécanisme d'action d'agents pharmacologiques. Cet outil utilisable sur ordinateur ou supercalculateur repose sur la division des protéines en boîtes. Une expérience de *docking* est réalisée simultanément sur

les différentes boîtes (parallélisation) ce qui induit une forte accélération des calculs par rapport aux méthodes classiques.

Le concept de docking moléculaire, ou amarrage moléculaire, est apparu pour la première fois en 1975 avec C. Levinthal* pour apporter des éléments de compréhension et de caractérisation des interactions établies entre l'hémoglobine et les fibres tubulaires dans la formation de globules rouges falciformes responsables de la drépanocytose. Aujourd'hui, le docking est très largement utilisé et permet de modéliser l'interaction d'au moins deux molécules et de prédire quel assemblage moléculaire est le plus stable. Le docking moléculaire est utilisé dans plusieurs cas :

i) l'étude de l'interaction d'un ligand avec sa cible : l'utilisateur cherche à caractériser les interactions mises en jeu dans la liaison d'un ligand à son récepteur, ii) la recherche de cibles (docking inverse) : l'utilisateur dispose d'un ligand et de plusieurs récepteurs. Le but est alors d'identifier avec quel(s) récepteur(s) le ligand a le plus d'affinité pour identifier sa/ses cible(s) la/les plus probable(s) et iii) le criblage de ligands : l'utilisateur dispose d'un récepteur et cherche à connaître quel(s) ligand(s), parmi une base de données, a/ont le plus d'affinité pour celui-ci. Le criblage est dit à « haut débit » (*high throughput screening*) lorsqu'il fait intervenir de nombreux ligands et de nombreux récepteurs. Aujourd'hui, de nombreux logiciels sont disponibles pour réaliser des expériences d'amarrage moléculaire. Ils font appel à des algorithmes différents mais le principe reste le même : prédire les modes de liaisons d'un complexe et quantifier énergétiquement l'interaction résultante. D'une manière générale, une expérience d'amarrage moléculaire repose sur deux étapes cruciales : la recherche conformationnelle pour déterminer la géométrie des partenaires en interaction et le classement, ou scoring, des propositions de géométrie et d'énergétique des assemblages moléculaires.

* C. Levinthal, S. J. Wodak, P. Kahn, et A. K. Dadivanian, « Hemoglobin interaction in sickle cell fibers. I: Theoretical approaches to the molecular contacts. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 72, no 4, p. 1330 1334, avr. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.4.1330

Développé en 2014 dans sa version initiale et revu en 2020, AMIDE v2 apporte des améliorations substantielles de performance grâce notamment à l'utilisation d'AutoDock-GPU, une version parallélisée du logiciel AutoDock et à une refonte du système de soumission des calculs de *docking* afin de fiabiliser le processus et de permettre le calcul simultané d'un grand nombre de couples protéine-ligand. De plus, AMIDE v2 est à présent utilisable sur un supercalculateur ou sur un ordinateur personnel grâce à un script d'installation propre à chaque architecture matérielle et logicielle. Cette version améliorée a été développée dans le contexte de la pandémie de SARS-CoV-2 pour permettre le criblage *in silico* de larges bibliothèques de ligands (plusieurs centaines de milliers) sur des bibliothèques de protéines d'intérêt (plusieurs dizaines de cibles), constituant ainsi un outil efficace de *docking* inverse à haut débit [23].

Dans le cas présent, AMIDE a été mis en œuvre pour identifier les cibles probables de la bétulone, de l'acide bétulonique, de son

dérivé ester méthylique et de l'acide bétulinique à partir d'une sélection de 87 protéines de *T. gondii* présentes dans la Protein Data Bank[21].

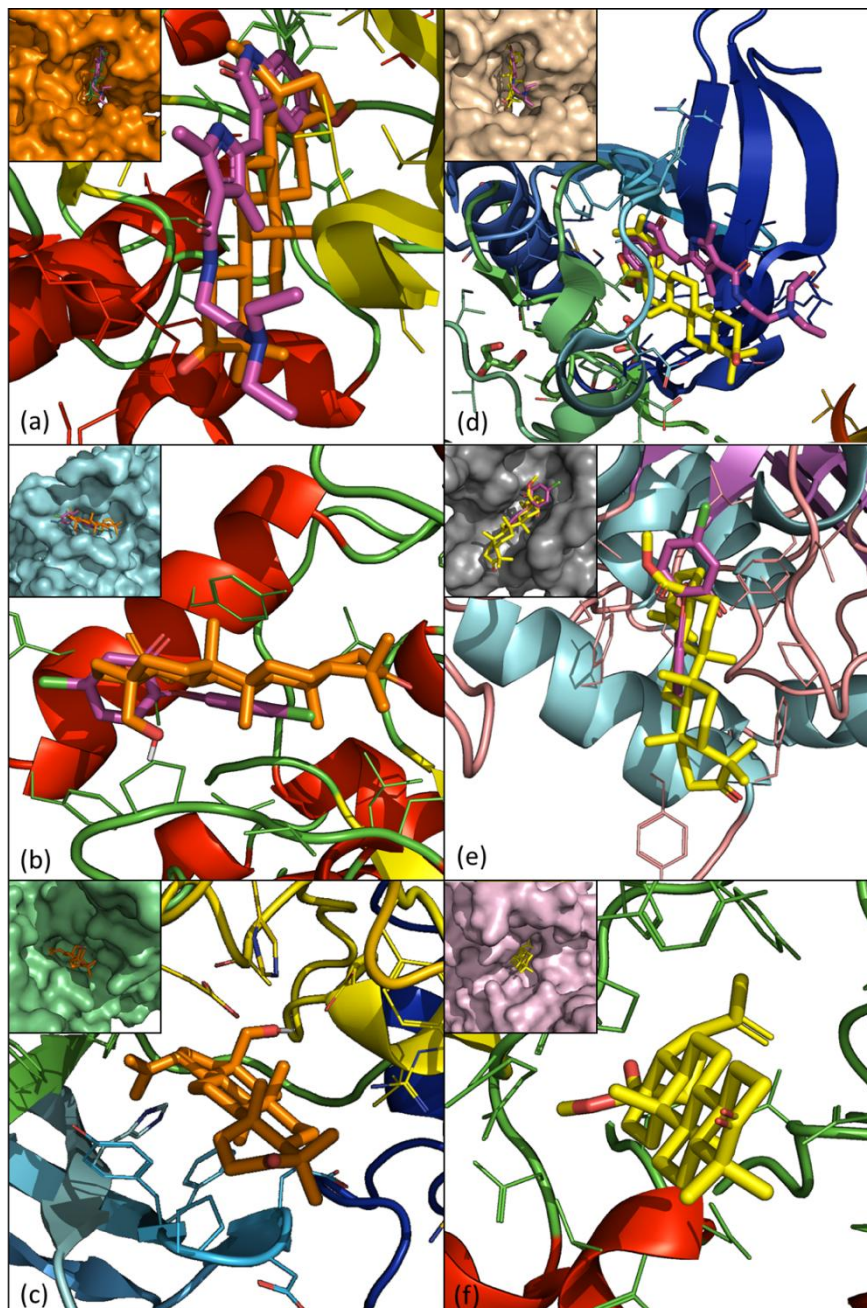


Figure 6. Visualisation par PyMol de la CDPK3 (3HZT), l'ENR (2050) et la ROP8 (3BYV). (a) CDPK3 avec bétulone (orange) et ligand co-cristallisé (PDB ID J60, rose). (b) ENR avec bétulone (orange) et triclosan (rose). (c) ROP8 avec bétulone (orange). (d) CDPK3 avec ester méthylique de l'acide bétulinique (jaune) et ligand co-cristallisé (PDB ID J60, rose). (e) ENR avec ester méthylique de l'acide bétulinique (jaune) et triclosan (rose). (f) ROP8 avec ester méthylique de l'acide bétulinique (jaune). Les encarts dans chaque case sont les colocalisations des ligands et des inhibiteurs connus (le cas échéant) dans la poche (représentation en surface).

Les cibles potentielles identifiées après analyse des résultats issus du traitement par AMIDE v2 sont l'ENR (Enoyl-acyl carrier protein reductase), la CDPK3 (calcium-dependent protein kinase 3) et

la ROP8 (Rhoptry protein 8) (figure 6). Ces protéines interviennent respectivement dans la synthèse des acides gras, la régulation des flux calciques (notamment nécessaire à la motilité du parasite) et l'invasion cellulaire. Par ailleurs, les triterpènes sont connus pour être capables de moduler la fluidité et la stabilité membranaires et pourraient être également impliqués à ce titre dans la régulation de processus biologiques du parasite (transduction de signal, adressage, organisation du cytosquelette, etc.). L'activité antiparasitaire des triterpènes pourrait alors être expliquée à la fois par un rôle d'inhibiteur protéique, mais aussi par leur action en tant que perturbateur membranaire. Néanmoins, même si ces triterpènes souscrivent aux règles de Lipinski, leur capacité à être absorbées par le tractus gastro-intestinal ou à passer la barrière hémato-encéphalique a été évaluée *in silico* comme faible, ce qui nécessite des travaux de pharmacomodulation ou de vectorisation avant de débiter des études *in vivo*.

Les règles de Lipinski, également appelées "règle de cinq" ou "Lipinsky's Rule of Five" à l'origine, sont un ensemble de critères physico-chimiques qui peuvent être utilisés pour prédire la capacité des candidats médicaments à être administrés par voie orale. Cela permet donc d'avoir une première appréciation de leur biodisponibilité. Ces règles ont été proposées pour la première fois en 1997 par le chimiste médicinal américain Christopher A. Lipinski. Elles consistent en quatre critères importants pour qu'une molécule soit considérée comme biodisponible, à savoir : une masse molaire inférieure à 500 g.mol⁻¹, un logP inférieur à 5, pas plus de 5 groupes donneurs de liaison hydrogène et pas plus de 10 groupes accepteurs de liaison hydrogène. De nombreux autres descripteurs ont été depuis proposés et permettent d'améliorer ce type simple d'approche prédictive.

Conclusion

À l'heure de la nécessaire prise de conscience des enjeux environnementaux et des nombreux travaux académiques ou industriels pour rendre la chimie plus durable afin d'améliorer l'efficacité avec laquelle les ressources naturelles sont employées, ces études démontrent que les écorces d'arbres de la région Grand-Est et plus largement des régions septentrionales peuvent être valorisées à différents égards. En effet, les écorces sont une source riche de composés naturels tels que des tannins, des flavonoïdes et des terpènes. Nos études ont démontré leur potentiel dans le domaine de la cosmétique, le développement de traitements antiparasitaires animaux ou à destination de l'Homme ou encore l'extension de l'arsenal thérapeutique contre des bactéries et des champignons. D'autres études sont en cours actuellement, notamment pour confirmer le potentiel de certains composés isolés d'écorces, avant d'entreprendre une campagne de tests sur souris infectées.

Par ailleurs, d'autres voies de valorisation sont explorées : des projets sont en cours, qu'ils soient de l'ordre de l'étude fondamentale, développés dans un marché de niche ou déjà présents à une plus grande échelle dans notre société. Nous pouvons citer la production de bioénergies (pellets de chauffage, conversion des écorces en biocarburant par pyrolyse ou gazéification), la

fabrication de fibre de carbone (l'écorce peut en constituer la matière première), la génération de charbon actif, ou encore l'utilisation comme source initiale de fabrication de matériaux biosourcés comme le papier.

Il ne s'agit que de quelques exemples et d'autres pistes de valorisation n'ont probablement pas encore été imaginées : les écorces méritent toute notre attention tant leurs applications dépendent de la diversité moléculaire qu'elles renferment.

References

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, **2020**, 83, p. 770-803.
- [2] O. Ajao, M. Benali, A. Faye, H. Li, D. Maillard, M. T. Ton-That, Multi-product biorefinery system for wood-barks valorization into tannins extracts, lignin-based polyurethane foam and cellulose-based composites: Techno-economic evaluation, *Ind. Crops Prod.*, **2021**, 167, p. 113435.
- [3] I. Mármol, J. Quero, N. Jiménez-Moreno, M. J. Rodríguez-Yoldi, et C. Ancín-Azpilicueta, A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 88, p. 558-566, juin 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.007.
- [4] M. Jablonsky, J. Nosalova, A. Sladkova, A. Haz, F. Kreps, J. Valka, S. Miertus, V. Frecer, M. Ondrejovic, J. Sima, I. Surina I., Valorisation of softwood bark through extraction of utilizable chemicals. A review , *Biotechnol. Adv.*, **2017**, 35, p. 726-750.
- [5] J. G. M. Ucella-Filho, A. da S. M. Freire, J. C. Carréra, F. M. F. Lucas, S. M. Zucolotto, A. F. D. Júnior, F. A. Mori, Tannin-rich bark extract of plants as a source of antimicrobial bioactive compounds: A bibliometric analysis, *S. Afr. J. Bot.*, **2022**, 150, p. 1038-1050.
- [6] D. Zofou, F. Ntie-Kang, W. Sippl, S. M. N. Efange, Bioactive natural products derived from the Central African flora against neglected tropical diseases and HIV, *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30, p. 1098-1120.
- [7] A. S. van Wyk, G. Prinsloo, A review of the ethnobotanical uses, pharmacology, toxicology, management and cultivation of selected South African protected multi-purpose tree species, *S. Afr. J. Bot.*, **2019**, 124, p. 258-269.
- [8] M. Gupta U. K. Mazumder, R. S. Kumar, P. Gomathi, Y. Rajeshwar, B. B. Kakoti, V. T. Selven , Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 98, p. 267-273.
- [9] S. Häsler Gunnarsdottir, L. Sommerauer, T. Schnabel, G. J. Oostingh, et A. Schuster, Antioxidative and Antimicrobial Evaluation of Bark Extracts from Common European Trees in Light of Dermal Applications, *Antibiotics*, 2023, 12, 130, doi: 10.3390/antibiotics1201013.
- [10] E. Burlacu et C. Tanase, Anticancer Potential of Natural Bark Products—A Review, *Plants*, 2021, 10, 1895, doi: 10.3390/plants10091895.

- [11] S. Krief, M. A. Huffman, T. Sévenet, C. M. Hladik, P. Grellier, P. M. Loiseau, R. W. Wrangham, Bioactive properties of plant species ingested by chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in the Kibale National Park, Uganda. *Am. J. Primatol.* **2006**, 68, p. 51-71.
- [12] J. Hubert, A. Angelis, N. Aligiannis, M. Rosalia, A. Abedini, A. Bakiri, R. Reynaud, J.-M. Nuzillard, S. C. Gangloff, A. L. Skaltsounis, J.-H. Renault, *In vitro* dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees, *Planta Med.*, **2016**, 82, p. 1351-1358.
- [13] A. Abedini, S. Chollet, A. Angelis, N. Borie, J.-M. Nuzillard, A. L. Skaltsounis, R. Reynaud, S. C. Gangloff, J.-H. Renault, J. Hubert, Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography, *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1029-1030, p. 121-127.
- [14] L. D. Sibley, « *Toxoplasma gondii*: Perfecting an Intracellular Life Style: Intracellular Survival of Toxoplasma », *Traffic*, **2003**, 4, p. 581-586.
- [15] Toxoplasmose | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/toxoplasmose> (consulté le 24 février 2020).
- [16] D. Hill, J. P. Dubey, *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2002**, 8, p. 634-640.
- [17] P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, R. V. Tauxe, Food-Related Illness and Death in the United States, *Emerg Infect Dis.*, **1999**, 5, p. 607-625.
- [18] A. Angelis, J. Hubert, N. Aligiannis, R. Michalea, A. Abedini, J.-M. Nuzillard, J. S. C. Gangloff, A. L. Skaltsounis, J.-H. Renault, bio-guided isolation of methanol-soluble metabolites of common spruce (*Picea abies*) Bark by-Products and Investigation of Their Dermo-Cosmetic Properties, *Molecules*, **2016**, 21, doi: 10.3390/molecules21111586.
- [19] J. Hubert, J.-M. Nuzillard, S. Purson, M. Hamzaoui, N. Borie, R. Reynaud, J.-H. Renault, identification of natural metabolites in mixture: a pattern recognition strategy based on ¹³ C NMR, *Anal. Chem.*, **2014**, 86, p. 2955-2962.
- [20] A. Abedini, M. Colin, J. Hubert, E. Charpentier, A. Angelis, H. Bounasri, B. Bertaux, A. Kotland, F. Reffuveille, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, S. C. Gangloff, Abundant extractable metabolites from temperate tree barks: the specific antimicrobial activity of *Prunus Avium* Extracts, *Antibiotics*, **2020**, 9, doi:10.3390/antibiotics9030111
- [21] P. Darme, S. Escotte-Binet, J. Cordonnier, S. Remy, J. Hubert, C. Sayagh, N. Borie, I. Villena, L. Voutquenne-Nazabadioko, M. Dauchez, S. Baud, J.-H. Renault, D. Aubert, Anti-*Toxoplasma gondii* effect of lupane-type triterpenes from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) and identification of a potential target by reverse docking, *Parasite*, **2022**, 29, doi: 10.1051/parasite/2022008.
- [22] R. Vasseur S. Baud, L. A. Steffenenel, X. Vigouroux, L. Martiny, M. Krajecki, M. Dauchez, AMIDE - Automatic Molecular Inverse

- Docking Engine for large-scale protein targets identification, *Int. J. Adv. Life Sci.*, **2014**, 6, p. 325-337.
- [23] P. Darne, M. Dauchez, A. Renard, L. Voutquenne-Nazabadioko, D. Aubert, S. Escotte-Binet, J.-H. Renault, I. Villena, L.-A. Steffemel, S. Baud, AMIDE v2: High-Throughput Screening based on AutoDock-GPU and improved workflow leading to better performance and reliability, *Int. J. of Mol. Sci.*, **2021**, 22, doi: 10.3390/ijms22147489.