

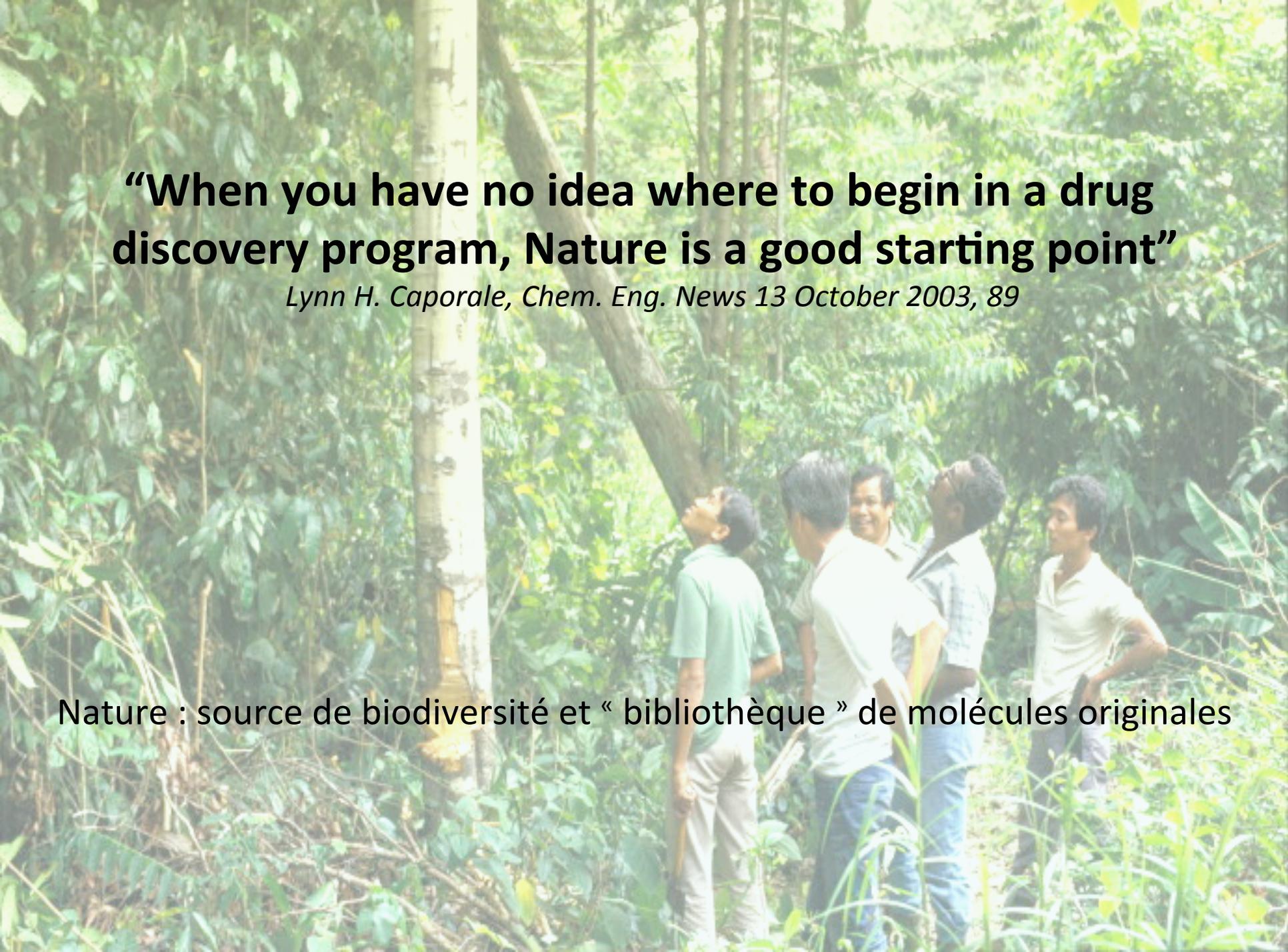
# Plantes, molécules et cancer

**Fanny ROUSSI**

*Responsable équipe "Métabolites de végétaux : isolement, synthèse et bioactivité"*

A photograph of lush green leaves and branches, likely from a tropical plant, filling the bottom half of the slide.

***CENTRE D'ALEMBERT, Université Paris Sud, 8 décembre 2016***

A group of five men are standing in a dense, lush forest. They are all looking upwards, towards the tall trees and the canopy. The forest is filled with various types of green plants, including large leaves and thin branches. The lighting is bright, suggesting a sunny day. The men are dressed in casual attire, including polo shirts and trousers. The overall scene conveys a sense of exploration and discovery in nature.

**“When you have no idea where to begin in a drug discovery program, Nature is a good starting point”**

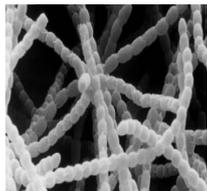
*Lynn H. Caporale, Chem. Eng. News 13 October 2003, 89*

Nature : source de biodiversité et « bibliothèque » de molécules originales

# Substances naturelles bioactives

✧ La Nature est une source régulière de nouveaux médicaments

✧ > 50% des médicaments ont une connexion avec la Nature (75% pour les anti-cancéreux)



## Micro-organismes

(bactéries, champignons...)

Million d'espèces ?

<10% des bactéries étudiées

<5% des champignons étudiés



## Plantes

300 000 espèces ?

≈ 10% étudiées



## Organismes marins

(éponges, algues, coraux...)

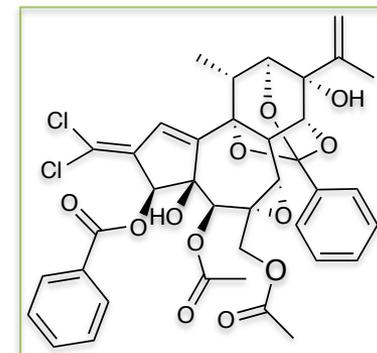
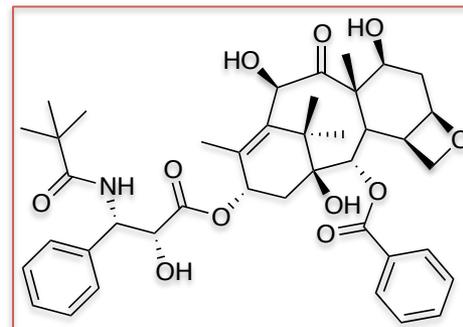
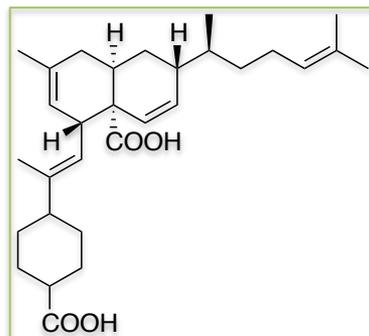
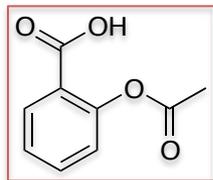
500 000 espèces ?

très peu étudiées

Biodiversité

Diversité chimique  
Diversité structurale

Outils biologiques  
Médicaments



# Substances naturelles bioactives

- ✧ Les molécules isolées des produits naturels qui présentant une activité biologique sont des **métabolites secondaires**
- ✧ ≠ métabolites primaires, ils ne sont pas impliqués dans les processus de croissance des organismes vivants mais jouent un **rôle écologique** primordial.
- ✧ Chez les végétaux, ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'**adaptation des plantes à leur environnement**. Ils participent à la tolérance à des stress variés (attaques de pathogènes, prédatations d'insectes, sécheresse, lumière UV...).

Herbivorie par les larves de lépidoptères



Aggression  
→  
←  
Composés volatils



*Maïs*

Schnee *et al.*, PNAS 2006, 103, 1129

Ces métabolites secondaires constituent la base des principes actifs que l'on retrouve dans les plantes médicinales

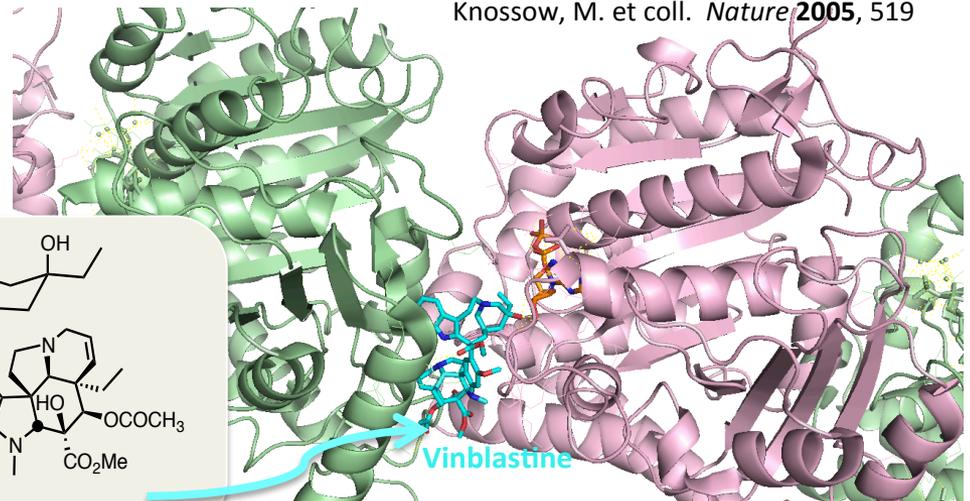
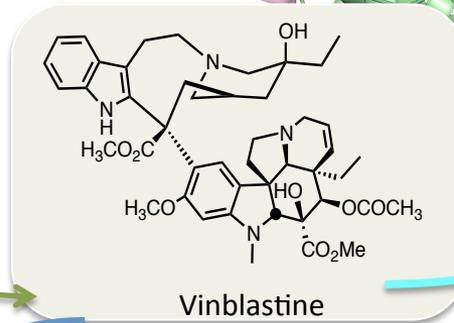
# Pourquoi les métabolites II<sup>aires</sup> sont-ils souvent bioactifs ?

- ✧ Ces métabolites ont des structures chimiques **originales et complexes**
- ✧ Cela résulte **d'une optimisation des interactions avec leur cible** qui a permis la survie des espèces au cours des millénaires
- ✧ **Les produits naturels sont "prévalidés" par la Nature** et peuvent être considérés comme des structures privilégiées (capables d'interagir avec d'autres cibles biologiques que leur cible primitive)



Pervenche de Madagascar

Synthèse  
par ≠ protéines

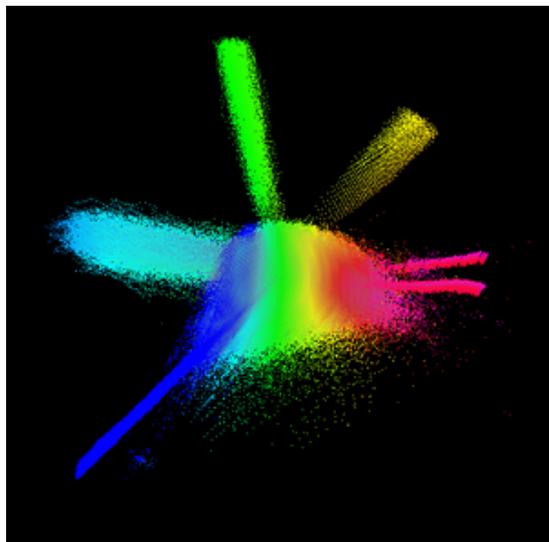


Intéragit avec la tubuline humaine  
cytotoxique puissant --> anti-cancéreux

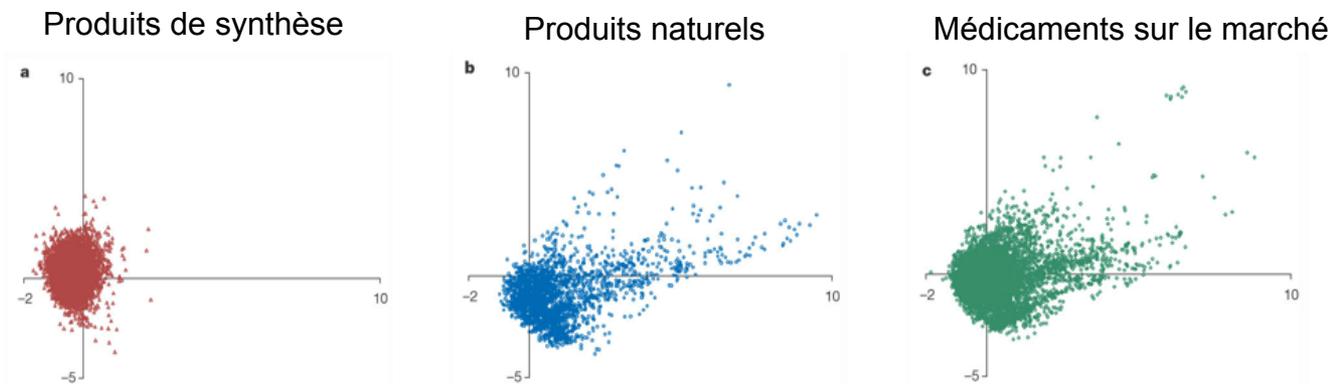
Rôle écologique pour la plante  
(interaction avec une protéine)

domaines d'interaction similaires

# Pourquoi les métabolites II<sup>aires</sup> sont-ils souvent bioactifs ?



Espace chimique représentant les  $10^{60}$  molécules pouvant avoir une activité biologique



La grande diversité structurale des produits naturels fait qu'ils **occupent une partie plus importante et différente de l'espace chimique** que les chimiothèques synthétiques et que **ce sont potentiellement de bons candidats pour des cibles biologiques nouvelles et/ou difficiles à cibler**

# Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)

- **Centre de recherche** du campus du CNRS de Gif-sur-Yvette **spécialisé en chimie**. L'ICSN est rattaché à l'Université Paris-Saclay
- 200 collaborateurs avec des activités de recherche à la frontière entre la chimie et la biologie
- Structuré en quatre départements

université  
PARIS-SACLAY



Dr Pierre Potier



Dr Nicole Langlois



Dr Françoise Guéritte



Dr Daniel Guénard



RMN à haut champs 950 MHz



Inspirés par la Nature

Navelbine® et Taxotère®



# Equipe Métabolites de Végétaux

isolement, synthèse et bioactivité

## VALORISATION DES METABOLITES SECONDAIRES DANS UN BUT THERAPEUTIQUE

### Prospection & Collecte



Collaborations internationales

LIA Malaisie & Vietnam

### Synthèse

Synthèse totale  
Chimie médicinale  
Pharmacomodulations

Sandy Desrat  
Fanny Roussi



### Phytochimie

Extraction  
Isolement de molécules  
Bio- ou Structure-guidée

Marc Litaudon  
Vincent Dumontet  
Cécile Appel

### Evaluations biologiques

Nombreuses collaborations nationales & internationales

### Méthodes analytiques

### Extractothèque

7800 Plantes

Accords de coopération

Convention de Rio(1992)  
Protocole de Nagoya (2010)

# Des récoltes au produit actif

**Collecte**  
et contrôle botanique



Dessins et herbiers



Séchage et broyage



**Extractothèque**

**Extraction EtOAc**



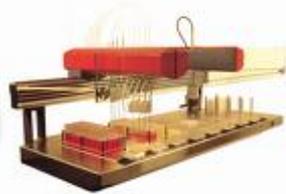
**Purification bioguidée**



**Extrait actif**

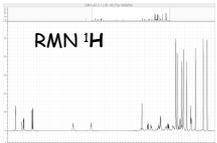
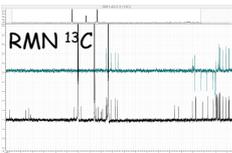
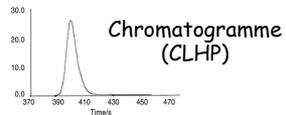


**Criblage biologique**



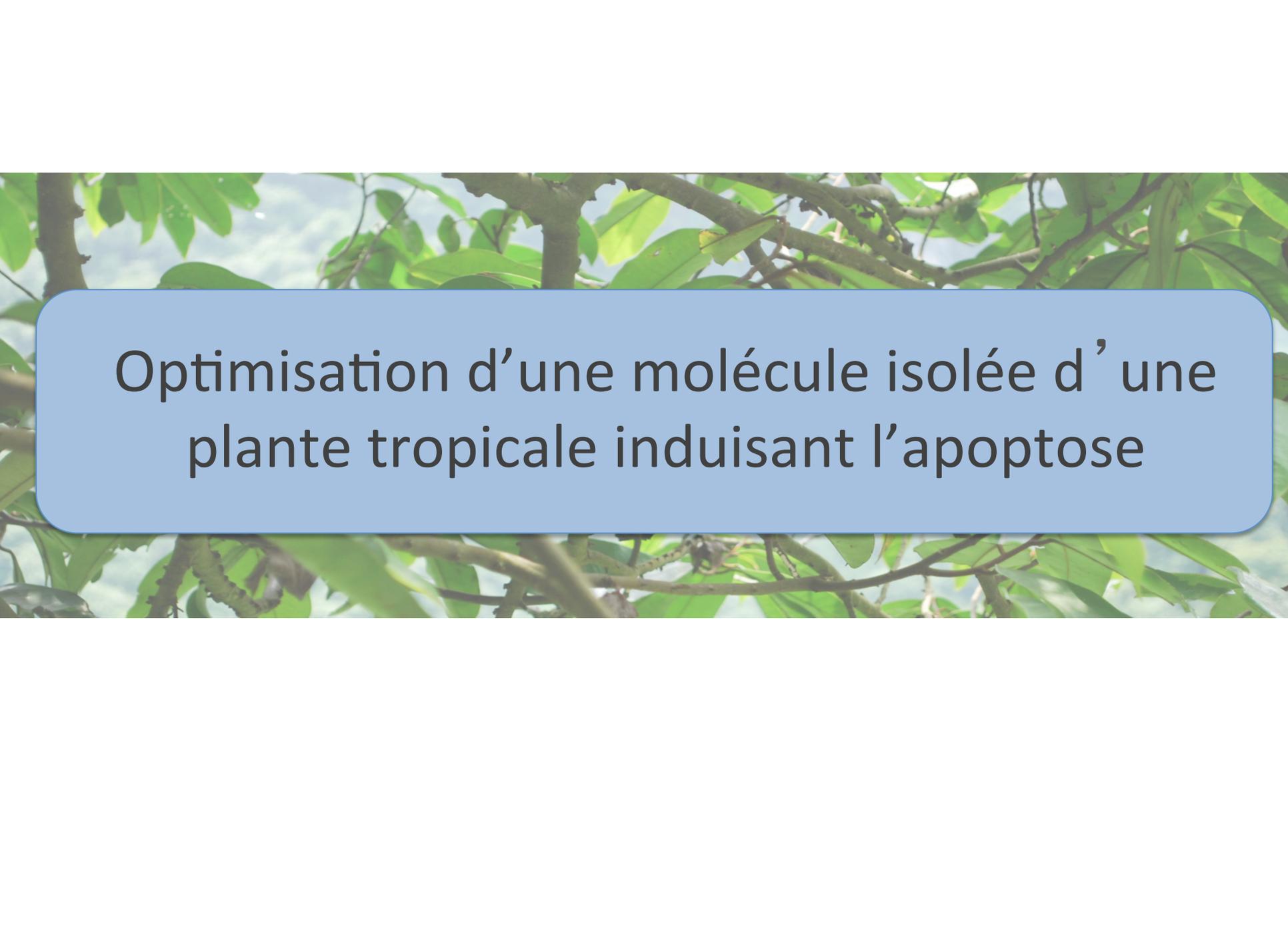
**Extraits**

Filtration (polyamide)  
Distribution en plaques 96 puits



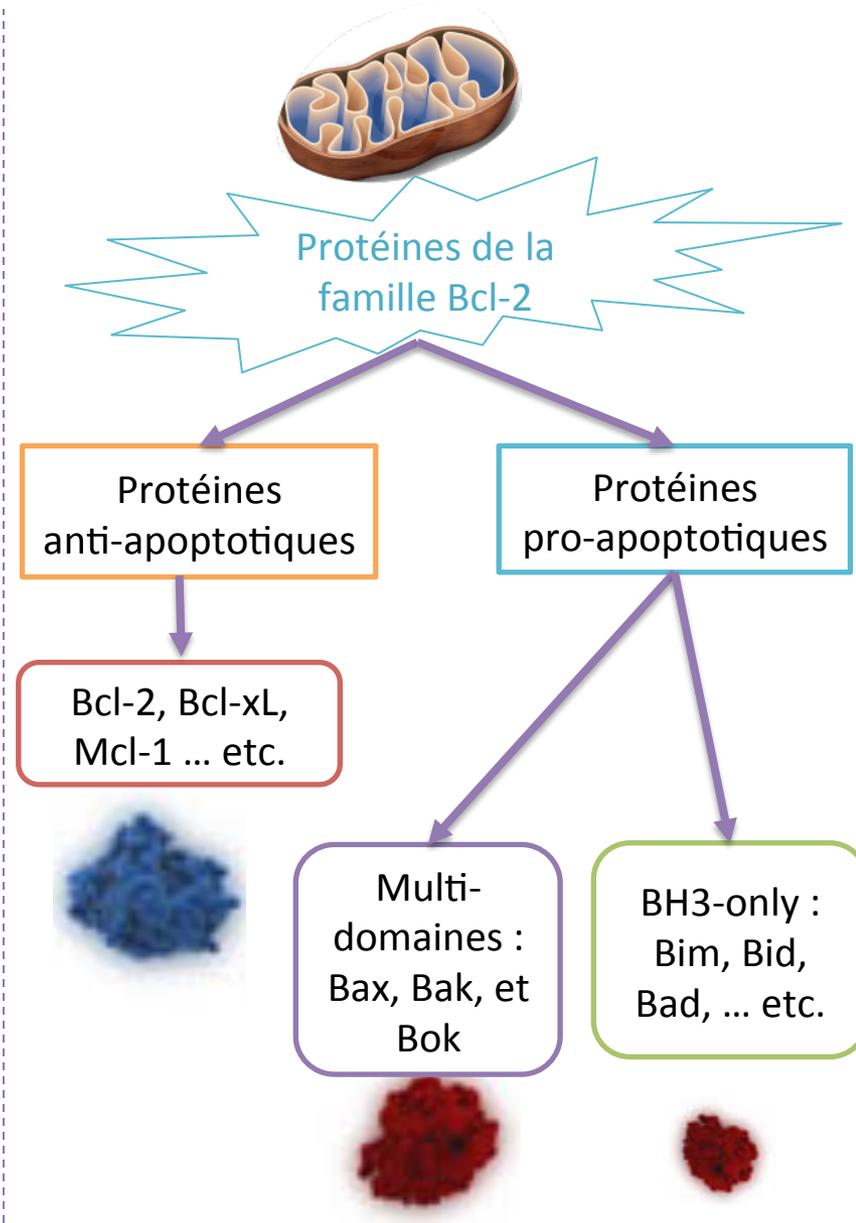
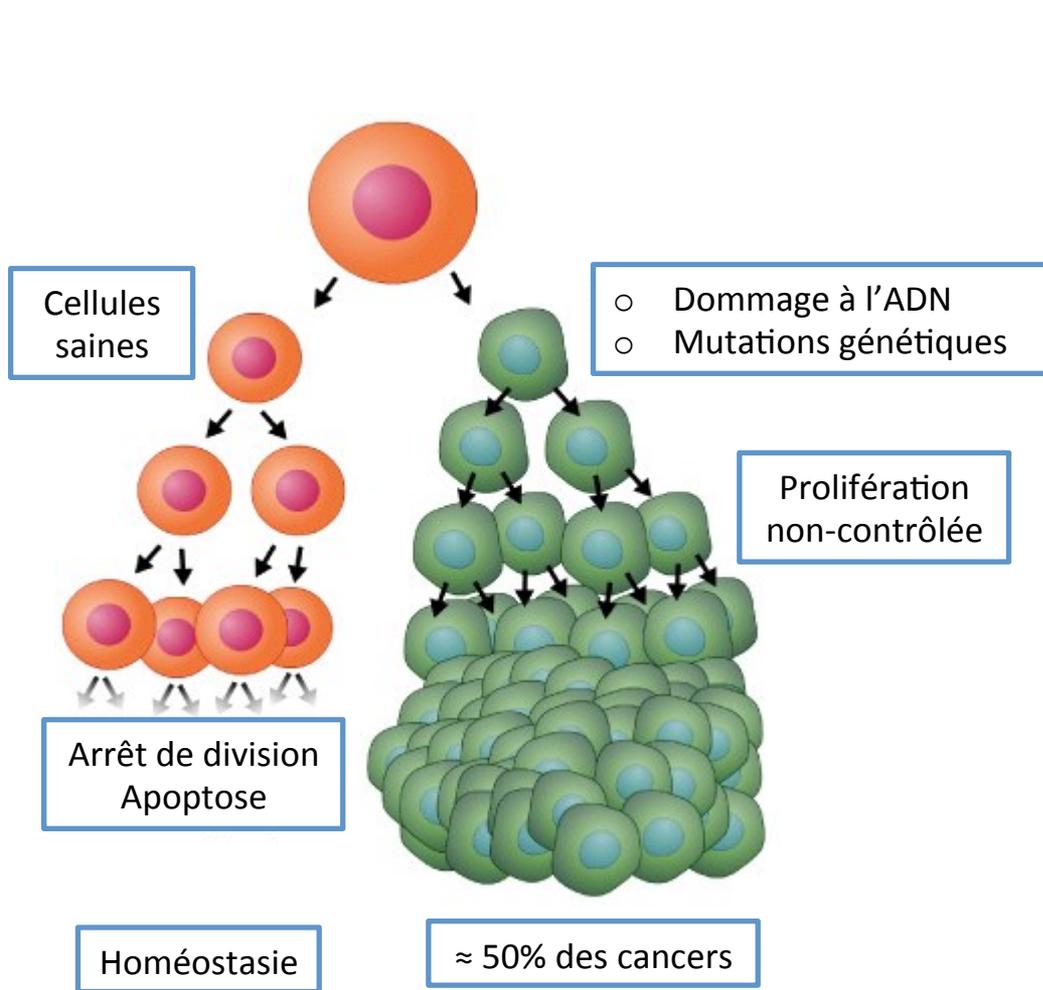
**Produit actif pur**  
(1 molécule)

**Programme de chimie Médicinale**  
(améliorer l'activité du composé par synthèse)

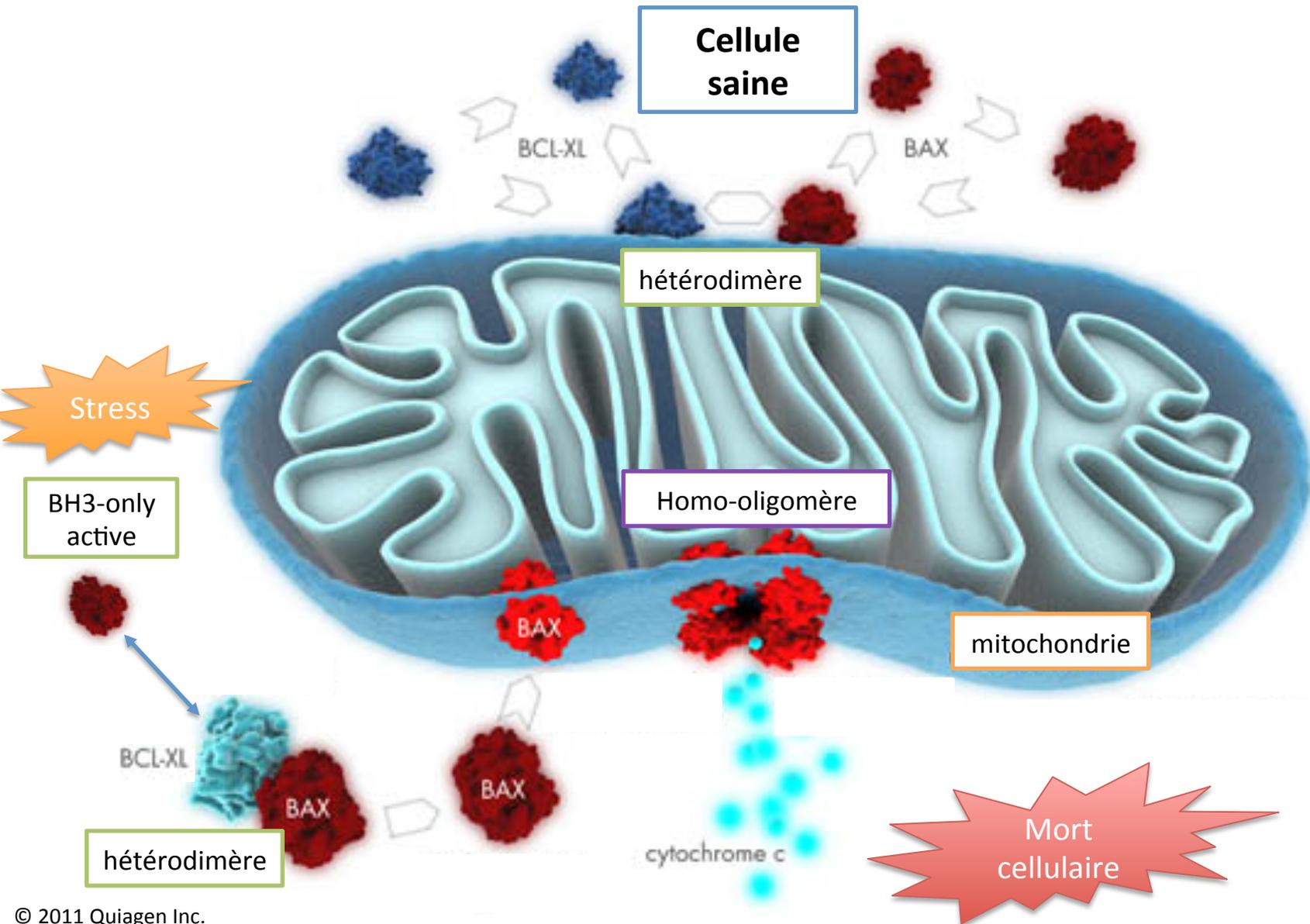


Optimisation d'une molécule isolée d'une  
plante tropicale induisant l'apoptose

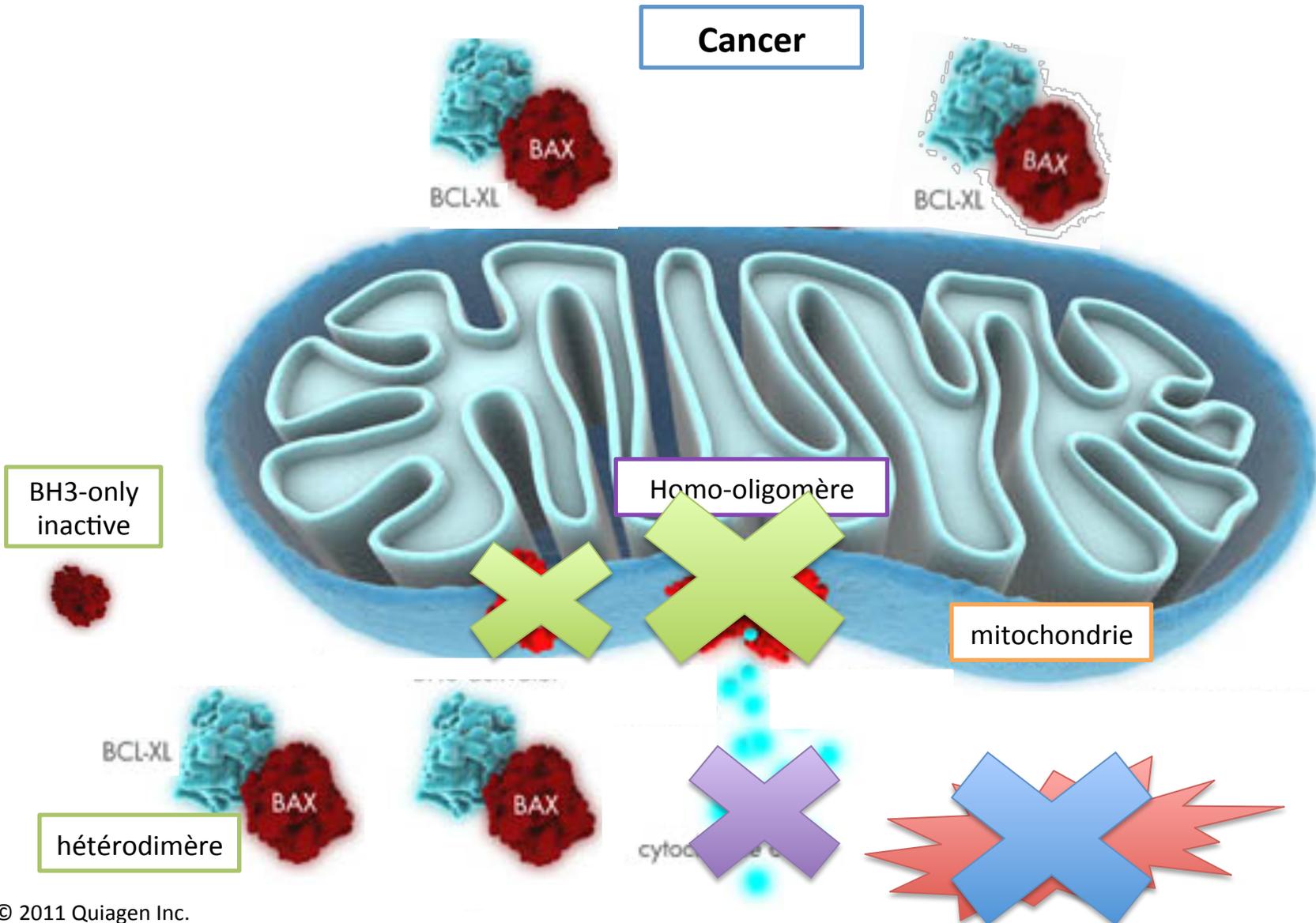
# L'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2



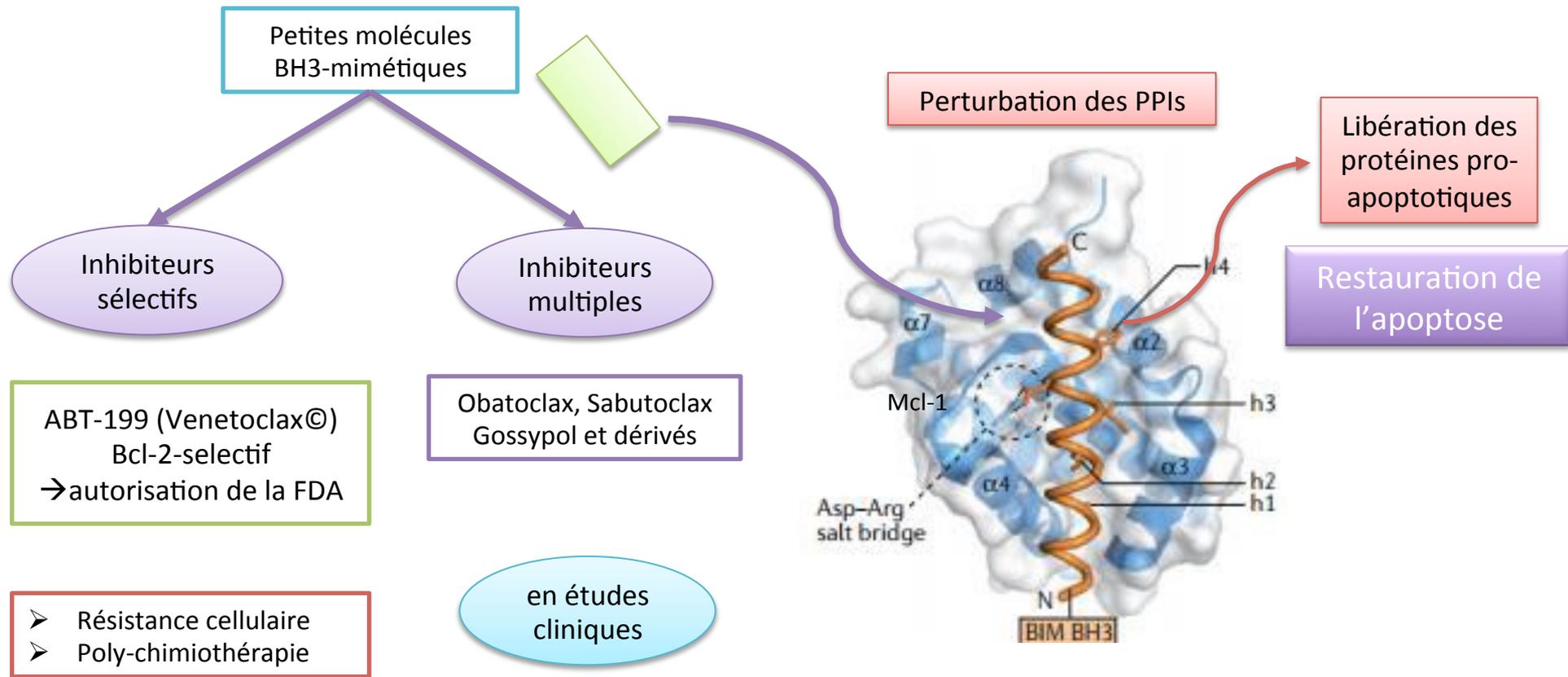
# L'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2



# L'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2



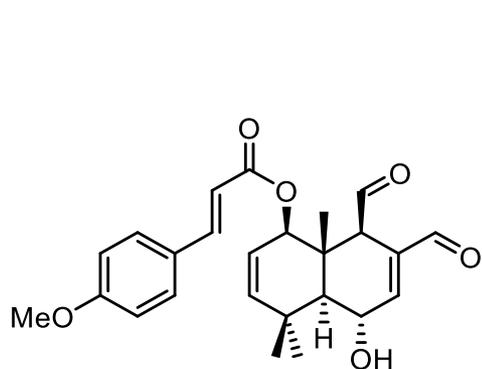
# Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des protéines de la famille BCL-2



# Isolement de molécules actives de l'extractothèque

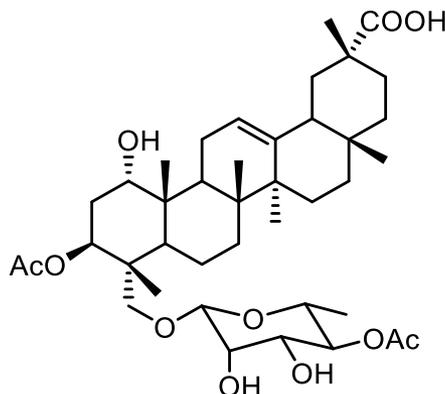
C. Gény  
A. Abou Samra

Tests biologiques sur trois protéines anti-apoptotiques : Bcl-xL ; Mcl-1 ; Bcl<sub>2</sub>



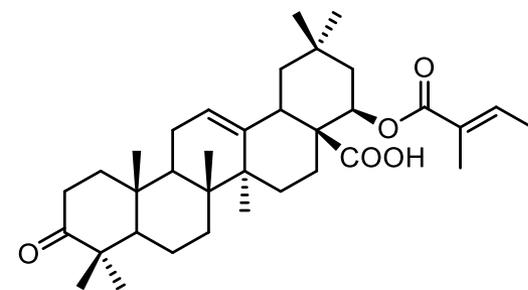
*Zygodium baillonii*

*Tetrahedron* **2008**, 64, 2192-2197



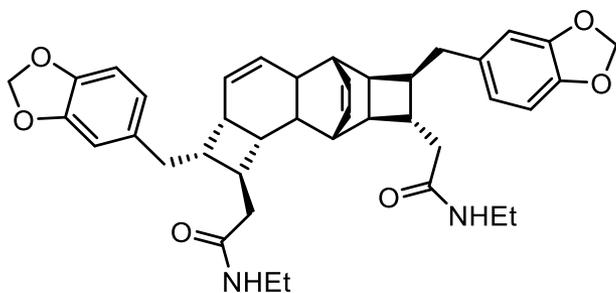
*Combretum sundaicum*

*J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1314-1320



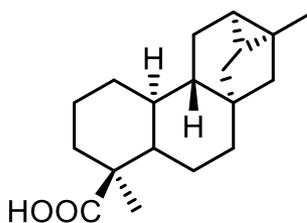
*Lantana camara*

*J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1314-1320



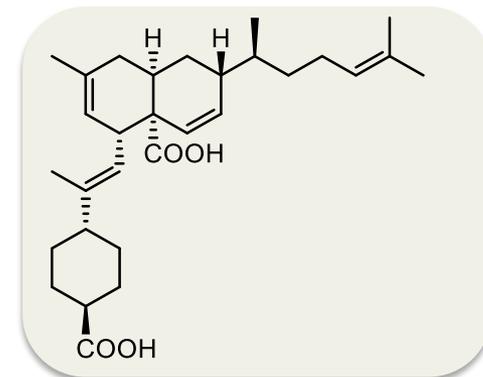
*Endiandra kingiana*

*Org. Lett.* **2010**, 12, 3638-3641  
*Phytochemistry* **2011**, 72, 1443-1452



*Xylopia caudata*

*J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 1121-1125



*Meiogyne cylindrocarpa*

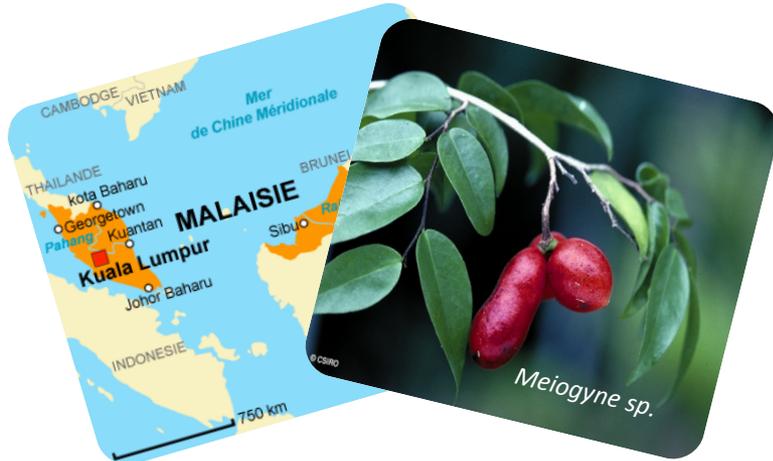
*J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 480-483



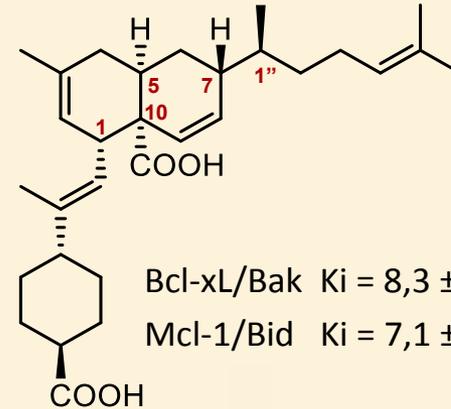
Grande diversité structurale

# La meiogynine A

Marc Litaudon, Khalijah Awang (Université Malaya, Malaisie) et Laboratoires Servier



*Meigyne cylindrocarpa*



Bcl-xL/Bak  $K_i = 8,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$

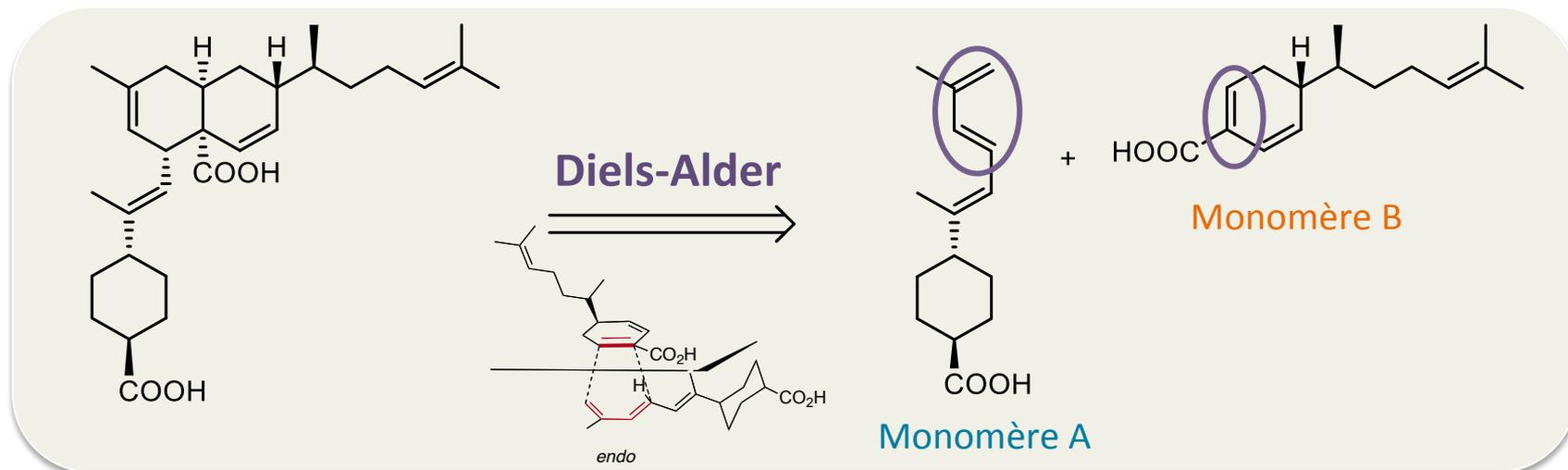
Mcl-1/Bid  $K_i = 7,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$

- dimère de sesquiterpènes
- *cis*-décaline, chaîne isoprénique, cyclohexyle *trans*
- configuration relative : 1*R*\*, 5*S*\*, 7*S*\*, 10*S*\*, 1''*R*\*

Pb d'approvisionnement / configuration absolue ?

# La meiogynine A : retrosynthèse

## Hypothèse biomimétique :



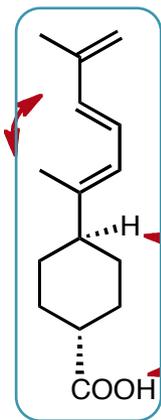
## Difficultés synthétiques potentielles :

- contrôle de la stéréochimie des doubles liaisons du **monomère A**
- synthèse sélective de quatre **monomères B** chiraux
- régiochimie de la cycloaddition de **Diels-Alder** finale

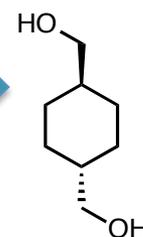
# Synthèse des monomères

## Monomère A

configuration E/E :  
sélectivité de 95%



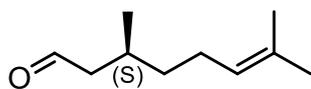
6 étapes, 24% de rendement



Homologation de Seyfert-Gilbert  
Carboalumination  
Couplage de Suzuki

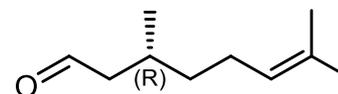
Substituants en *trans*

## Monomères chiraux B

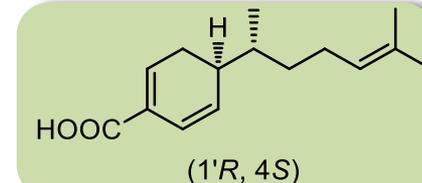
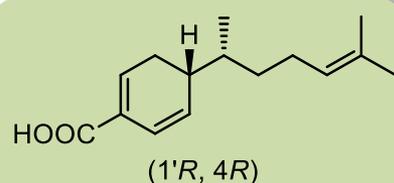
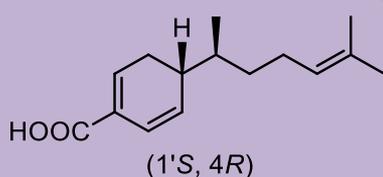
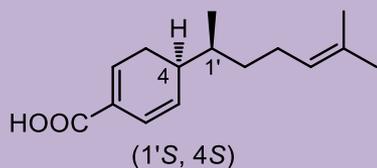


4 étapes, 64% rendement

Annélation de Robinson et carbonylation

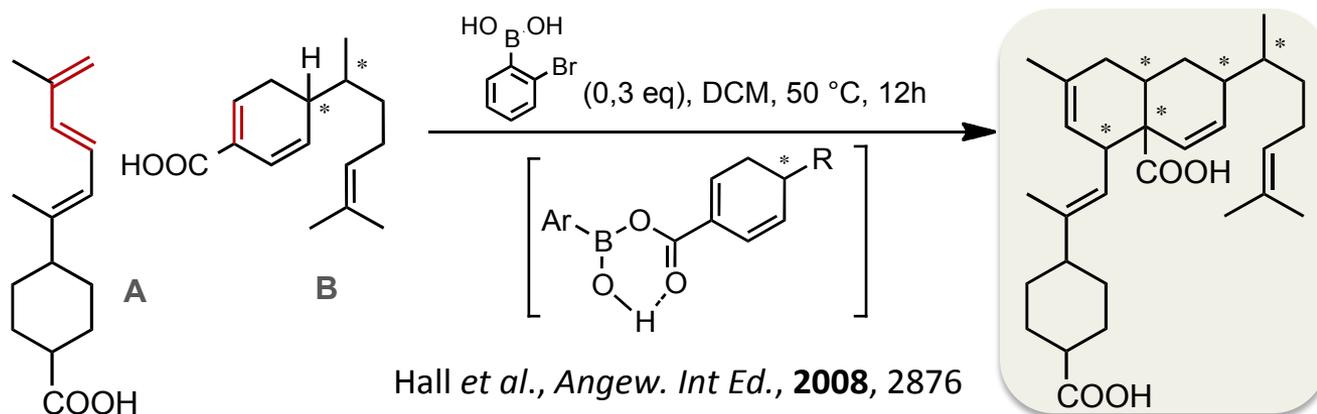


4 étapes, 66% rendement



# Fin de la synthèse totale de la Meiogynine A

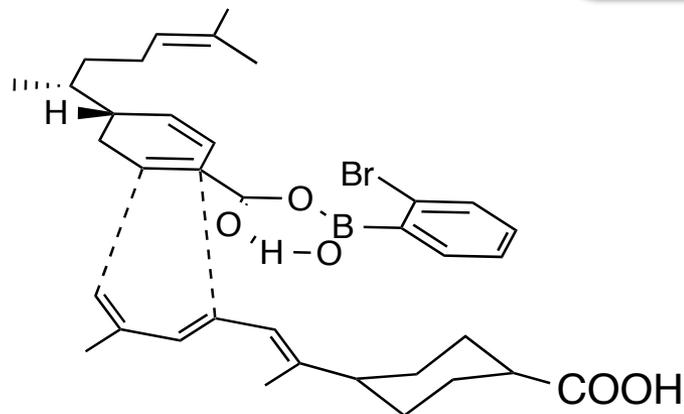
## Cycloaddition de Diels-Alder :



4 composés

Rdts de 60 à 74%  
endo/exo : 91/9

Hall *et al.*, *Angew. Int Ed.*, **2008**, 2876





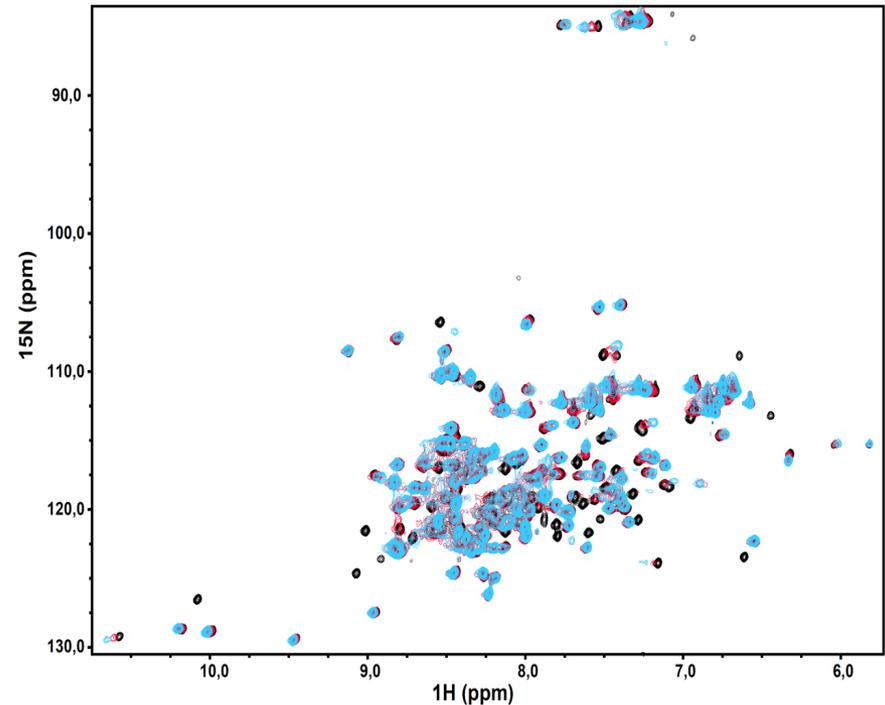
# Etudes RMN d'interaction protéines-ligand

N. Birlirakis, G. Rivière, S. Nogaret, O. Serve, E. Guittet (ICSN)

➤ Expériences par résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC des cibles protéiques en présence de la meiogynine A)



- ✧ Forte interaction du ligand avec les deux cibles Bcl-xL et Mcl-1
- ✧ Changement conformationnel des protéines
- ✧ Stoechiométrie 1:1, fixation du ligand dans le sillon hydrophobe des cibles

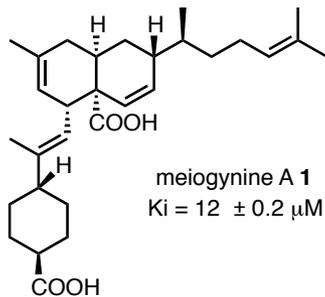
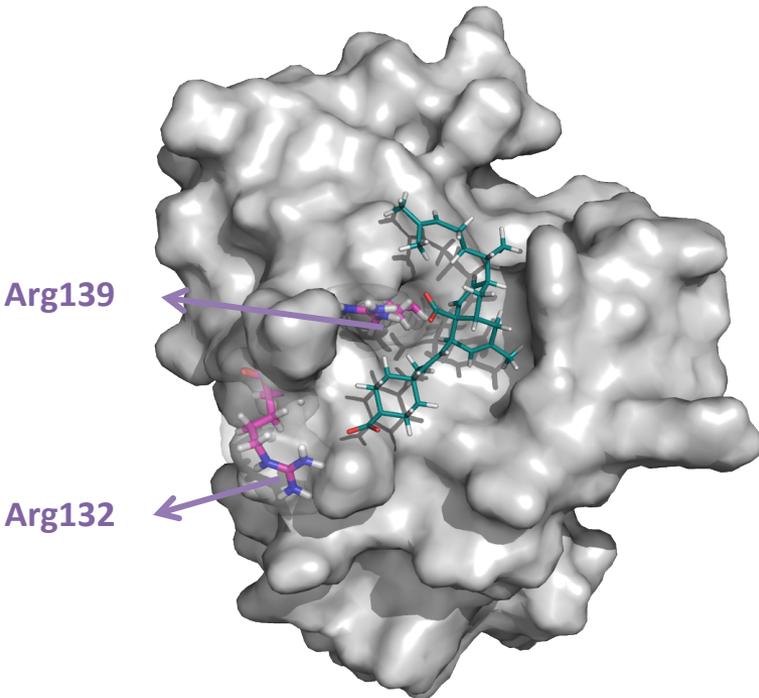


Spectre HSQC  $^{15}\text{N}$  de la protéine Bcl-xL  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -marquée seule (noir), en présence de la meiogynine A avec un ratio 1:1 (rouge) ou 2:1 (bleu) (ratio protéine : meiogynine A)

G. Rivière, N. Birlirakis, E. Guittet

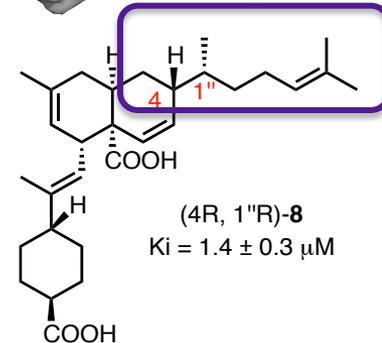
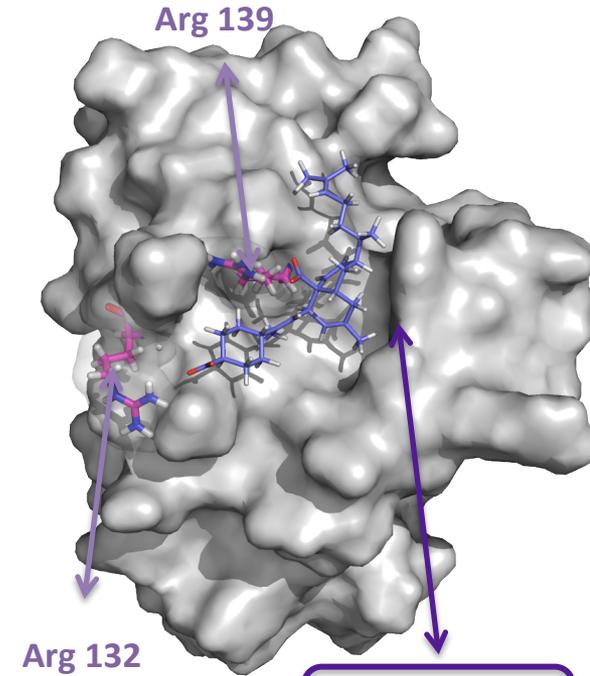
# 1<sup>ères</sup> études de modélisation moléculaire dans Bcl-xL

B. Iorga, C. Colas (ICSN)



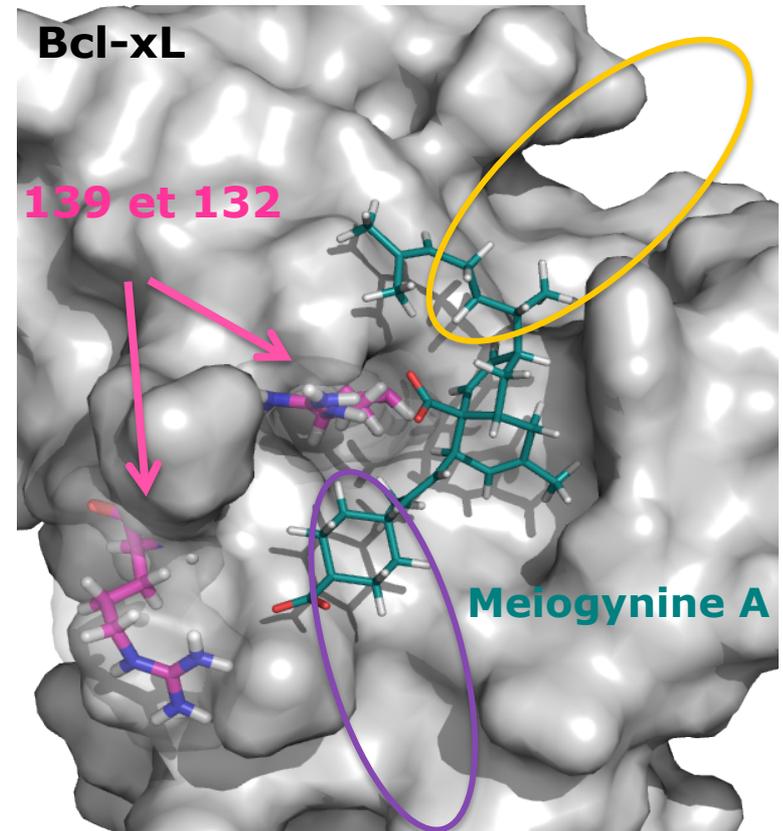
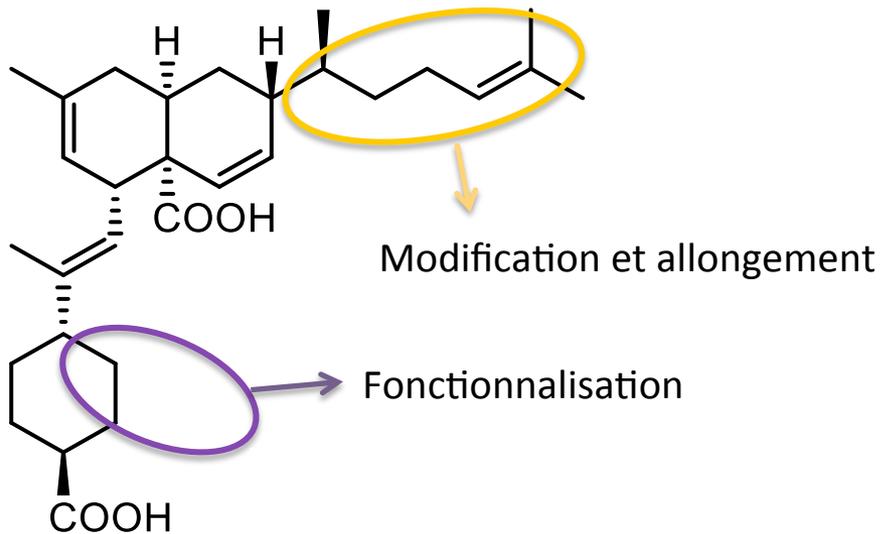
Mode d'interaction des analogues de la meiogyne A avec la protéine Bcl-xL :

- Hydrophobe
- Ionique (Arg132 et Arg139)

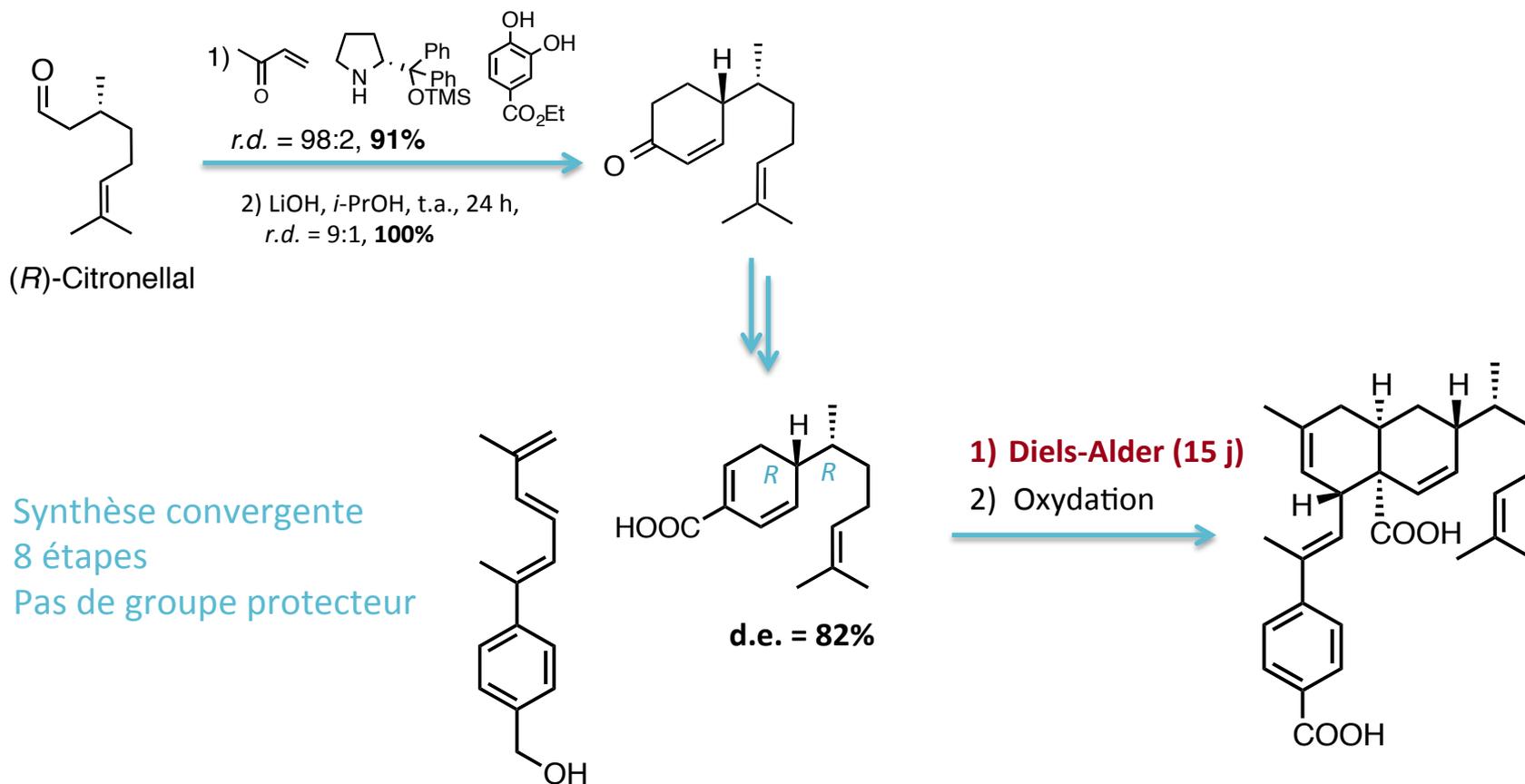


# 1<sup>ères</sup> études de modélisation moléculaire dans Bcl-xL

Proposition de structures potentiellement plus affines pour la protéine



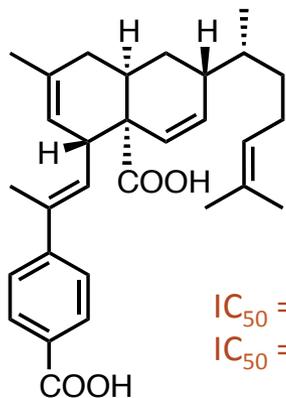
# Analogues de 1<sup>ère</sup> génération



- ❖ Synthèse convergente
- ❖ 8 étapes
- ❖ Pas de groupe protecteur

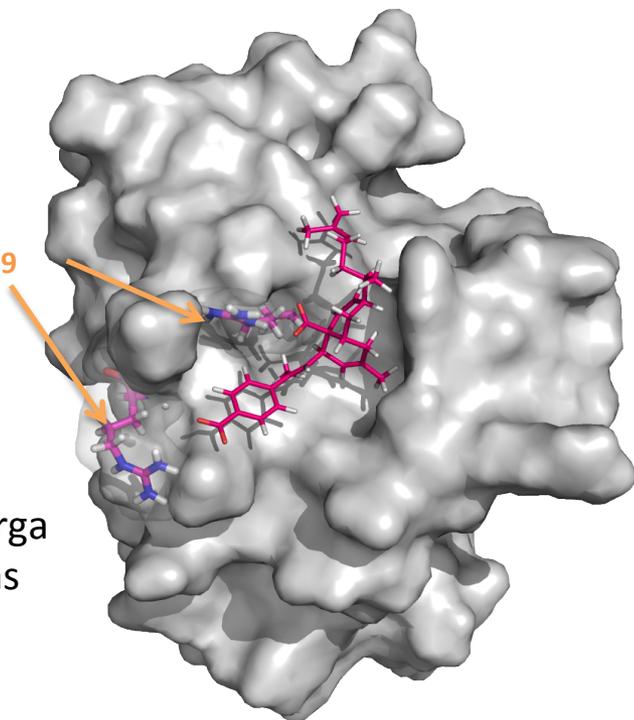
➤ **mais ... rendement de la Diels-Alder moyen (45%) et durée longue (15 jours à 1 mois)**

# Analogue de 1<sup>ère</sup> génération



$IC_{50} = 4,6 \mu M \pm 0,7$  Bcl-xL/Bak  
 $IC_{50} = 9,1 \mu M \pm 0,7$  Mcl-1/Bid

Arg 132 et 139

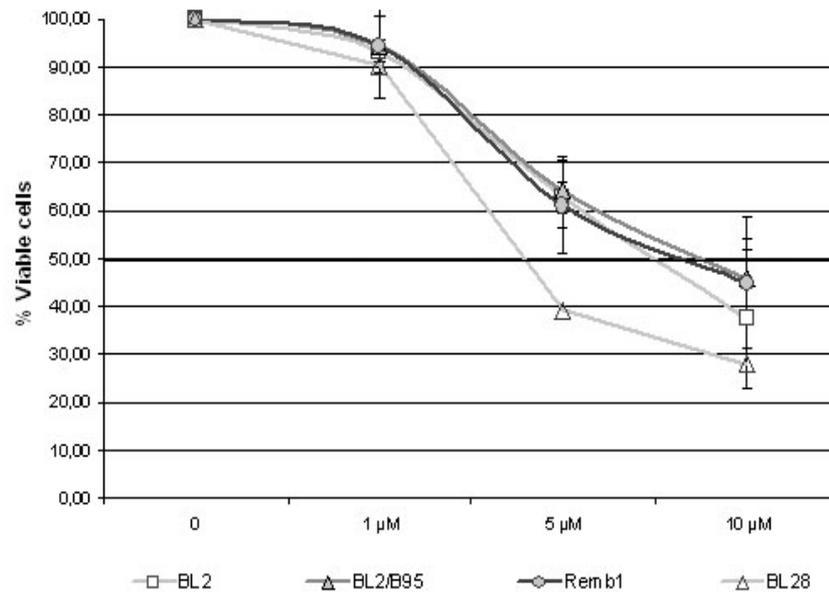


Bogdan Iorga  
 Claire Colas

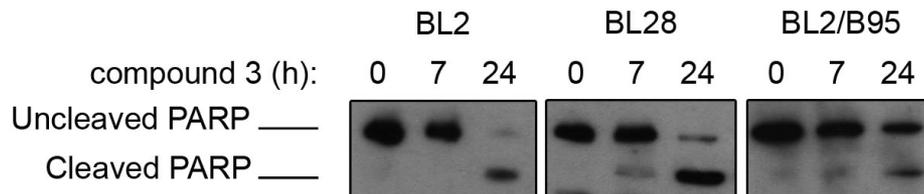


Anais Pujals, Joëlle Wiels

✧ Cytotoxique sur lignées de lymphomes sur-exprimant Bcl-xL et/ ou Mcl-1

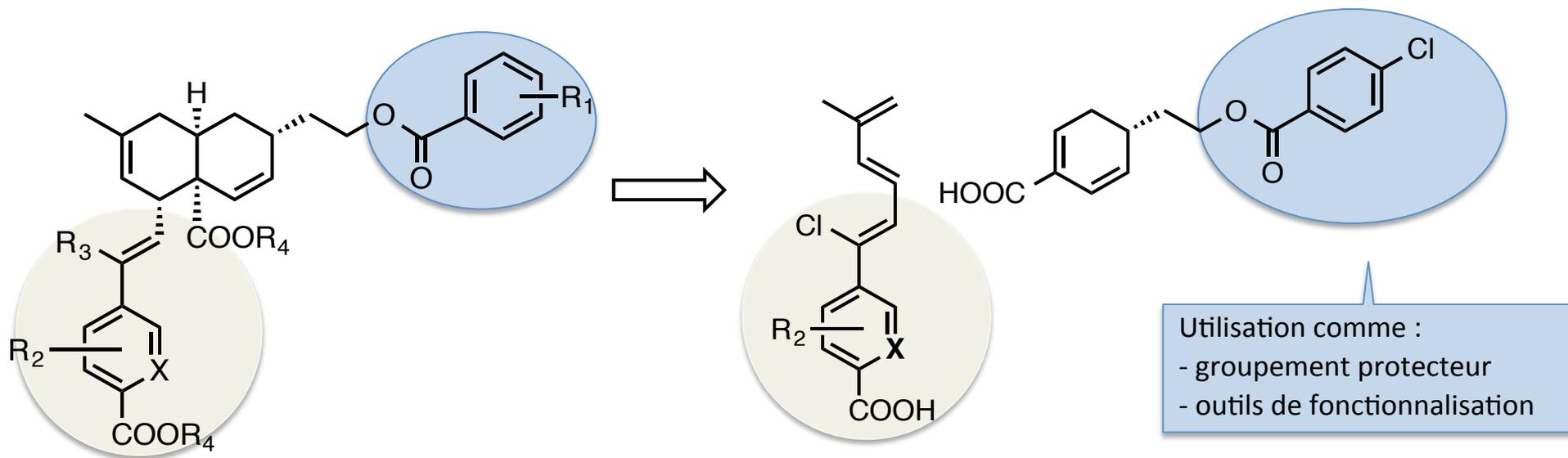


✧ Induit l'apoptose

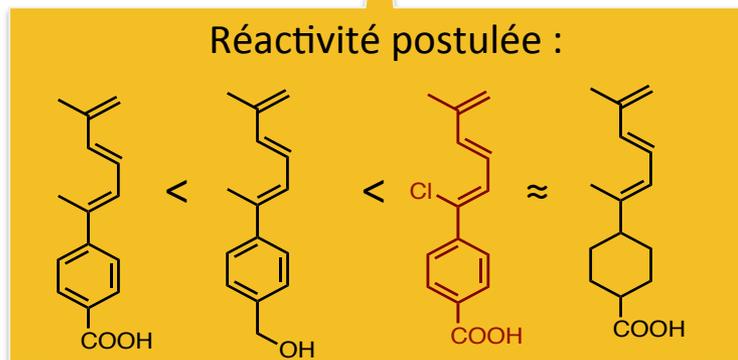


# Analogues de 2<sup>eme</sup> génération

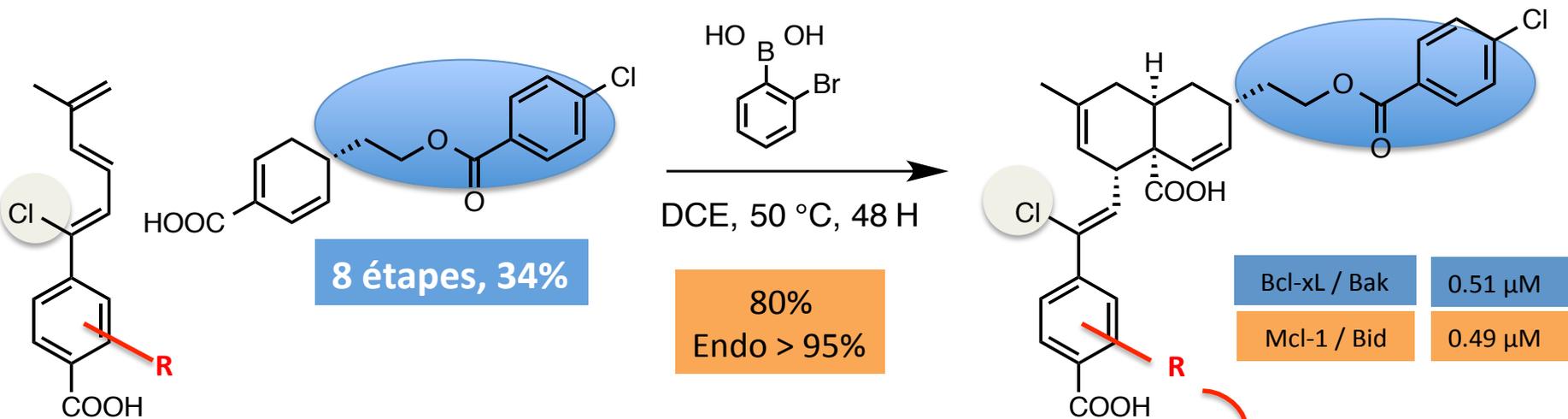
Camille Remeur, Sandy Desrat



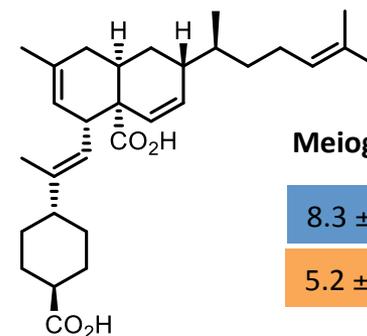
Utilisation comme :  
- groupement protecteur  
- outils de fonctionnalisation



# Fin de la synthèse des analogues de 2<sup>ème</sup> génération



Activité  $\Downarrow$

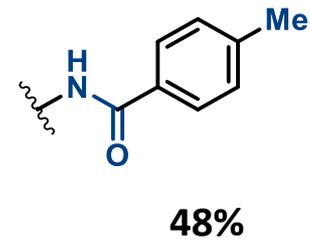
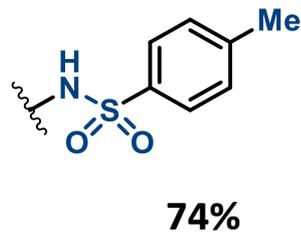
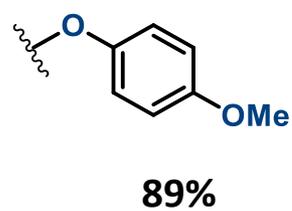
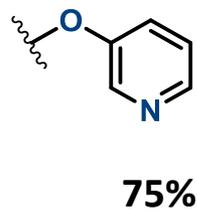
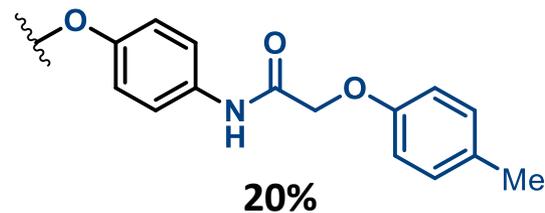
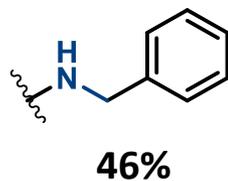
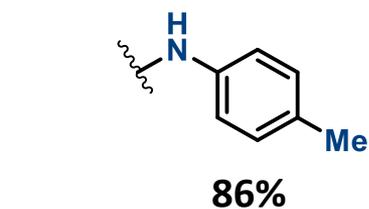
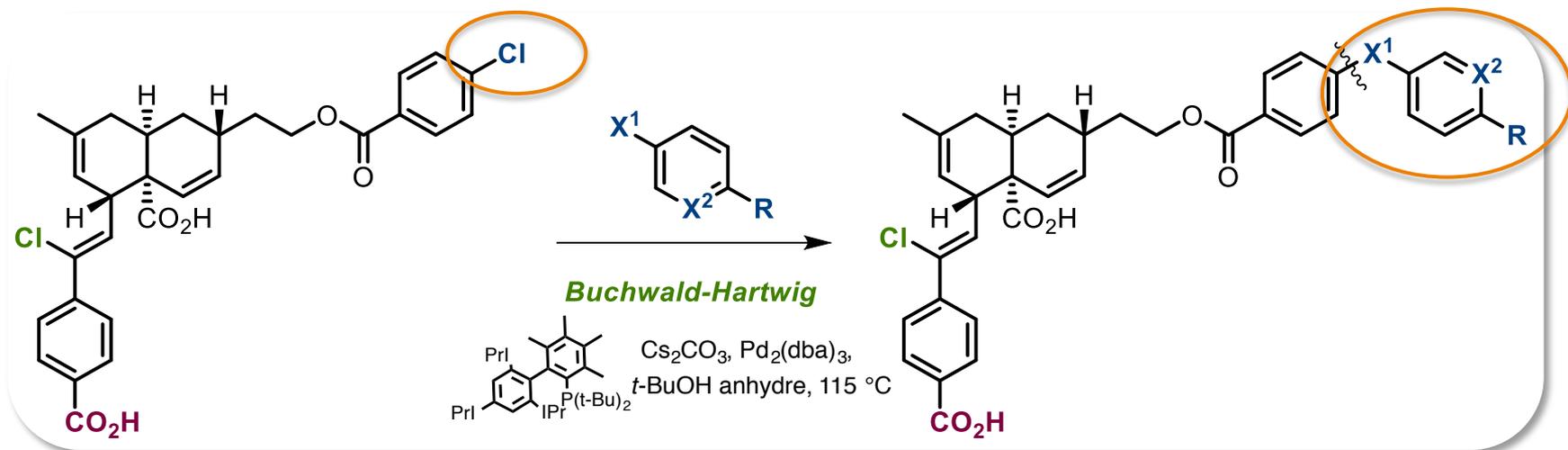


5 étapes, 46%

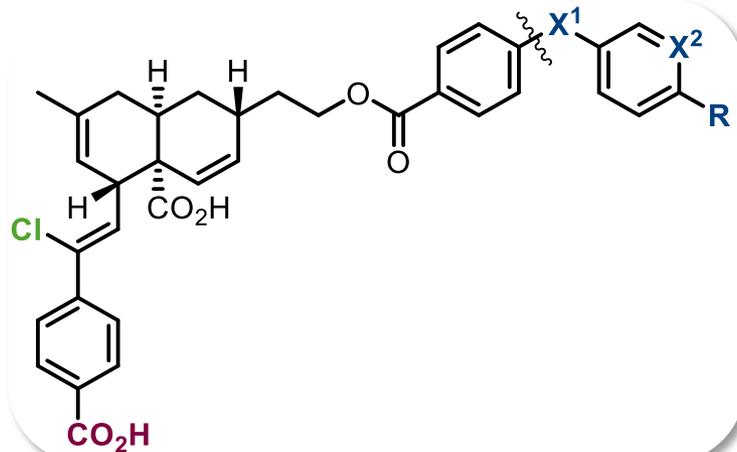
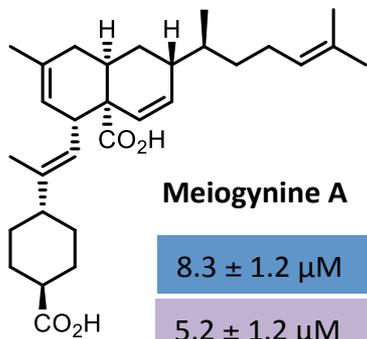
↑ Réactivité : 1 mois à 2 jours

↑ Sélectivité *endo/exo* 8:2 à > 95%

# Allongement de la chaîne latérale



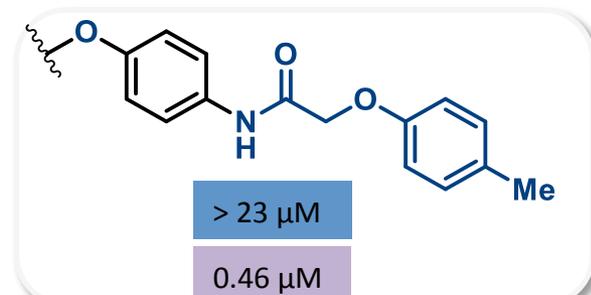
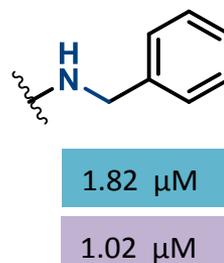
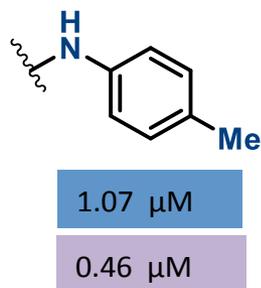
# Activité sur les protéines cibles



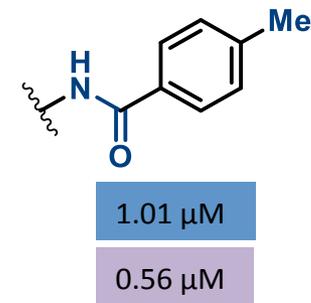
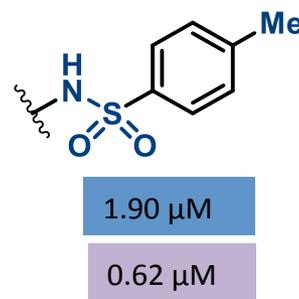
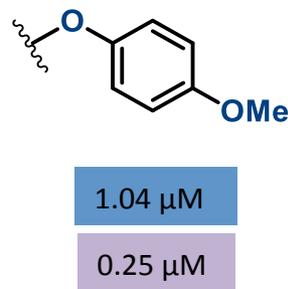
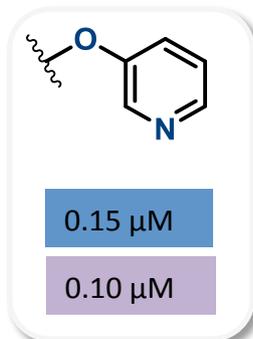
Bcl-xL / Bak

Mcl-1 / Bid

Inhibiteur de Mcl-1

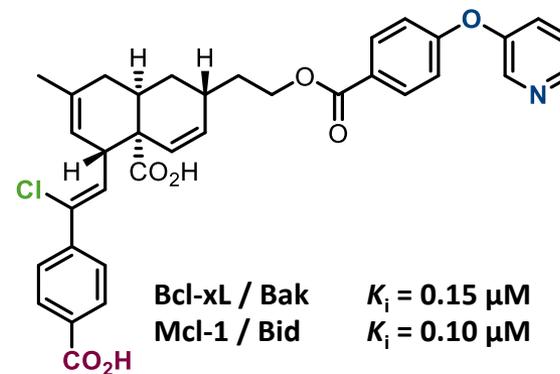
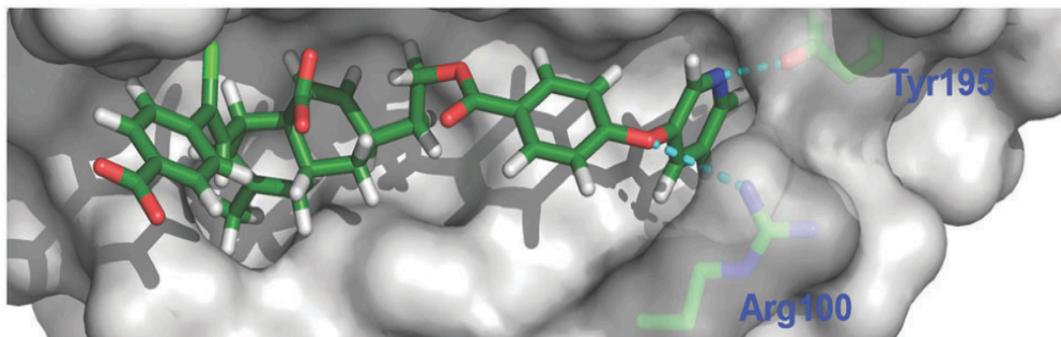
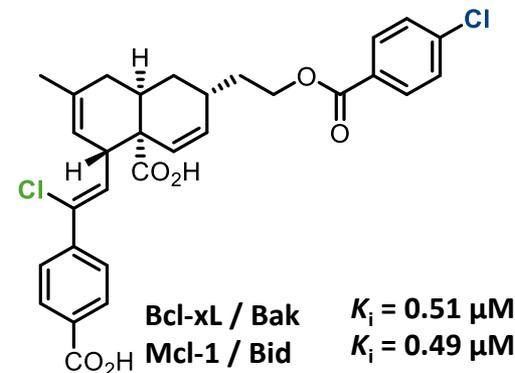
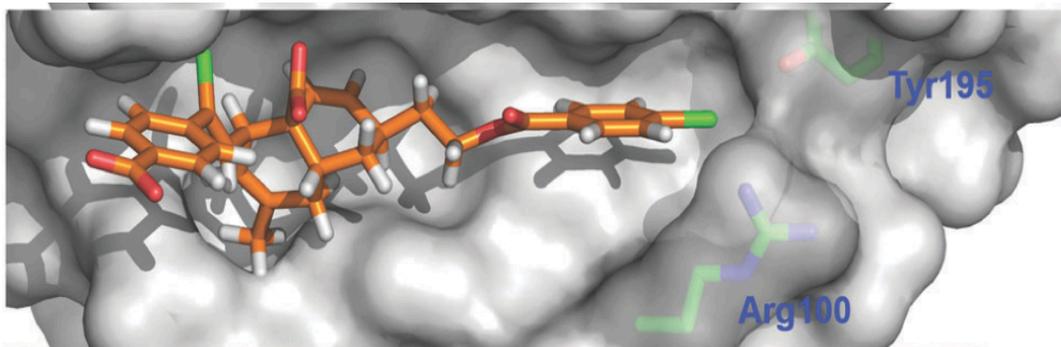


Activité x50



# Etudes de modélisation moléculaire

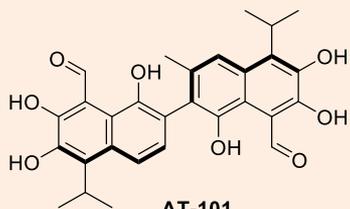
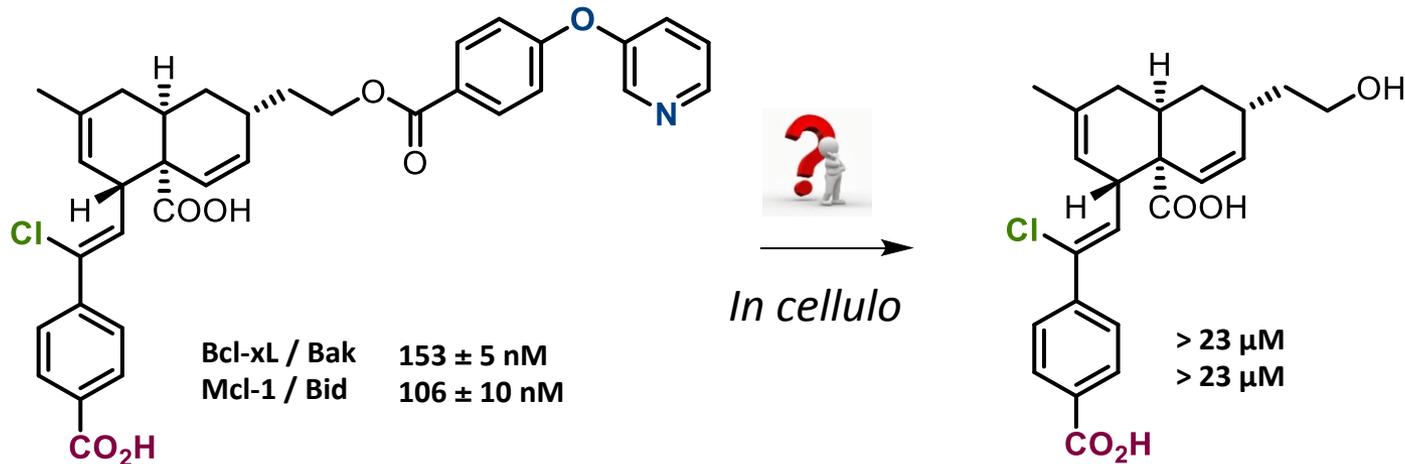
B. Iorga



➤ 2 liaisons hydrogène Arg100 et Tyr195

# Perspectives

Famille d'inhibiteurs duals de Bcl-xL et Mcl-1 mais ... non cytotoxiques



AT-101

(-)-Gossypol

Bcl-xL :  $CI_{50} = 480$  nM

Bcl-2 :  $CI_{50} = 320$  nM

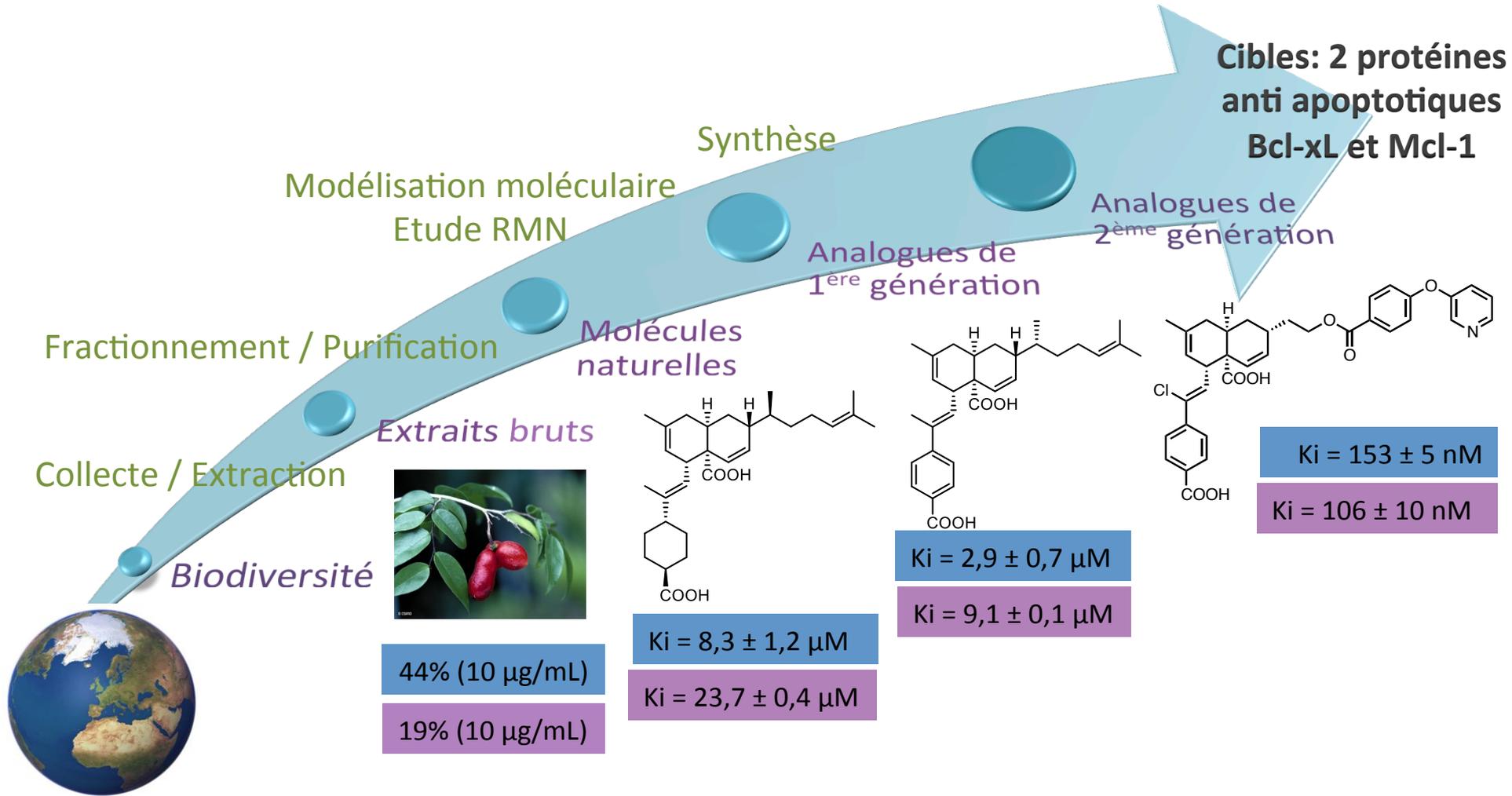
Mcl-1 :  $CI_{50} = 180$  nM

Phase II/III

Les dérivés de la meogynine sont également actifs sur Bcl-2 (inhibiteurs multiples)

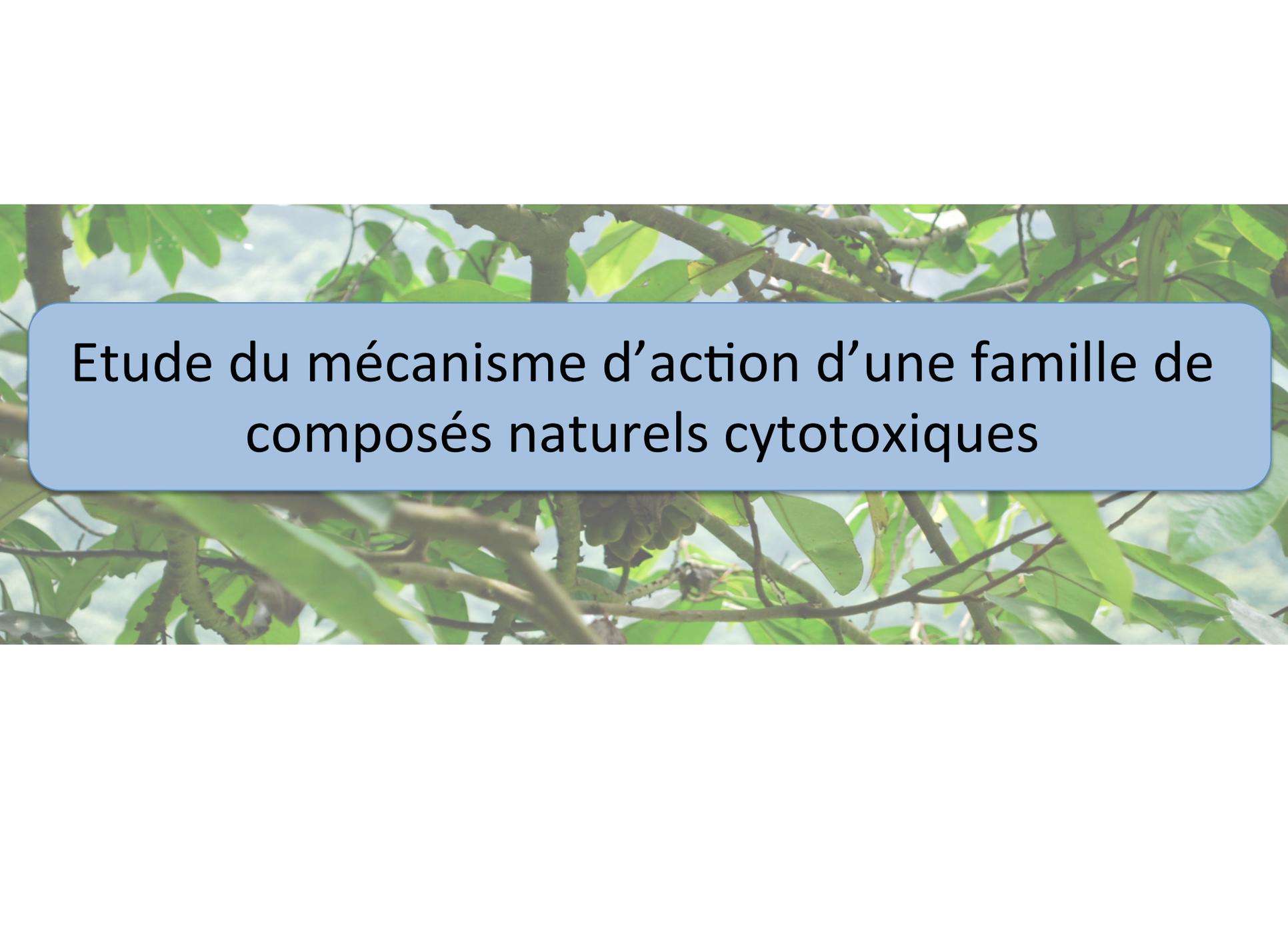
Remplacement de la fonction ester par un groupe non hydrolysable

# Conclusion et perspectives



Bcl-xL

Mcl-1



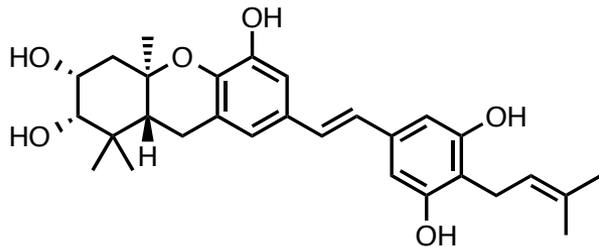
Etude du mécanisme d'action d'une famille de  
composés naturels cytotoxiques

# Une famille originale de produits naturels

Stilbènes prénylés isolés de *Macaranga* spp.



*Macaranga vedeliana*  
(Nouvelle Calédonie)  
**Védélianine**

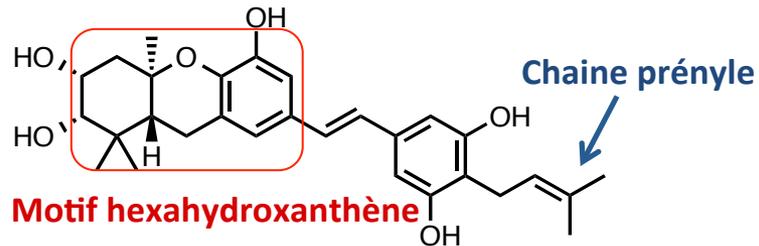


# Une famille originale de produits naturels

Stilbènes prénylés isolés de *Macaranga* spp.



*Macaranga vedeliana*  
(Nouvelle Calédonie)  
**Védélianine**



# Une famille originale de produits naturels

Stilbènes prénylés isolés de *Macaranga* spp.



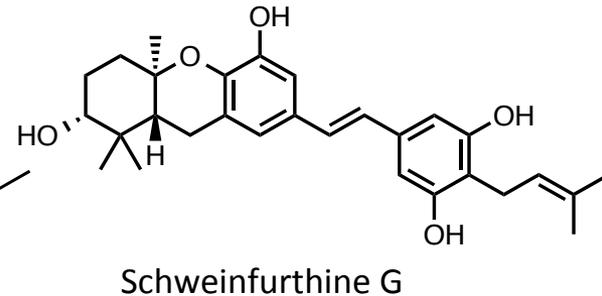
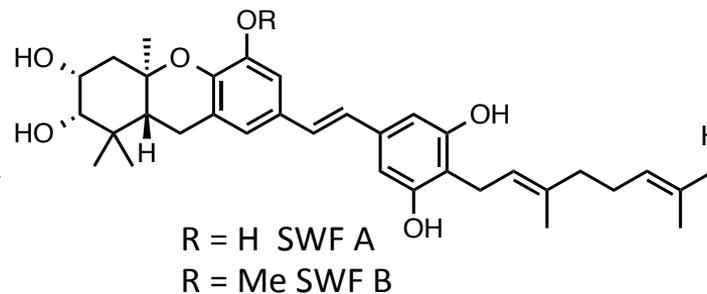
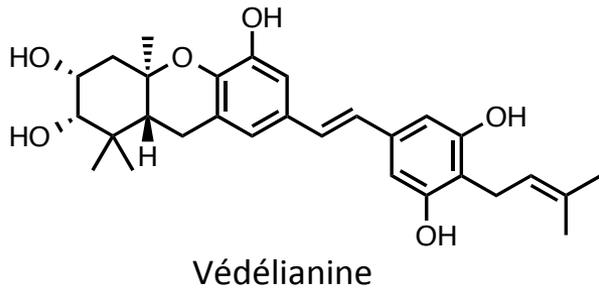
*Macaranga vedeliana*  
(Nouvelle Calédonie)  
**Védélianine**



*Macaranga schweinfurthii*  
(Cameroun)  
**Schweinfurthines A, B, C et D**



*Macaranga alnifolia*  
(Madagascar)  
**Schweinfurthines E, F, G et H**



# Des molécules d'intérêt pour le cancer

**Criblage du NCI sur 60 lignées cancéreuses**



## Lignées sensibles (nM)

SNC (SF-295/U87, Glioblastome ++)

Leucémie

Cancer du sein

Cancer du rein

## Lignées résistantes ( $\mu\text{M}$ )

Cancer du poumon (A549)

Mélanome

Cancer de l'ovaire

# Des molécules d'intérêt pour le cancer

**Criblage du NCI sur 60 lignées cancéreuses**



**Lignées sensibles (nM)**

SNC (SF-295/U87, Glioblastome ++)

Leucémie

Cancer du sein

Cancer du rein

**Lignées résistantes (µM)**

Cancer du poumon (A549)

Mélanome

Cancer de l'ovaire

**Algorithme COMPARE**

**Profil d'activité original**

(OSW-1, stelletine A, cephalostatine 1)

**Nouveau mécanisme d'action**  
**Nouvelle cible biologique**

**5 Brevets – Université d'Iowa et NCI**



# Etat de l'art et problématiques

## ➤ Limites pour l'obtention d'une grande quantité de produit

- Métabolites secondaires minoritaires dans les *Macaranga* spp.
- Faible rendement d'extraction ( $< 10^{-4}$  % , feuilles)



## ➤ Mécanisme d'action toujours inconnu ... mais plusieurs études réalisées

--> Interaction avec les **protéines OSBPs** (impliquées dans le transport intracellulaire du cholestérol) : cible réelle ? Jamais impliquée dans le cancer

C. H. Kuder et al. *Mol. Pharmacol.* **2012**, 82, 9

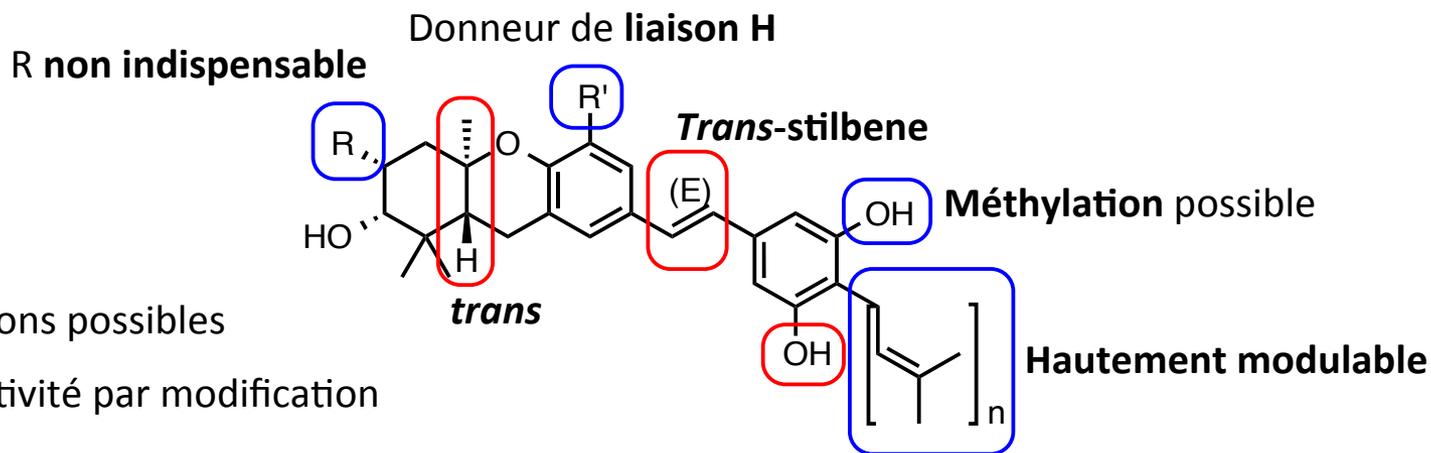
X. Bao et al. *Cancer. Biol. Ther.* **2015**, 16, 589

A.W. Burgett et al. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 639

# Etat de l'art et problématiques

➤ Une **synthèse totale**, nombreuses étapes (16 à 22) / rendement global faible (<1%)

➤ Relations **Structure** **Activité**



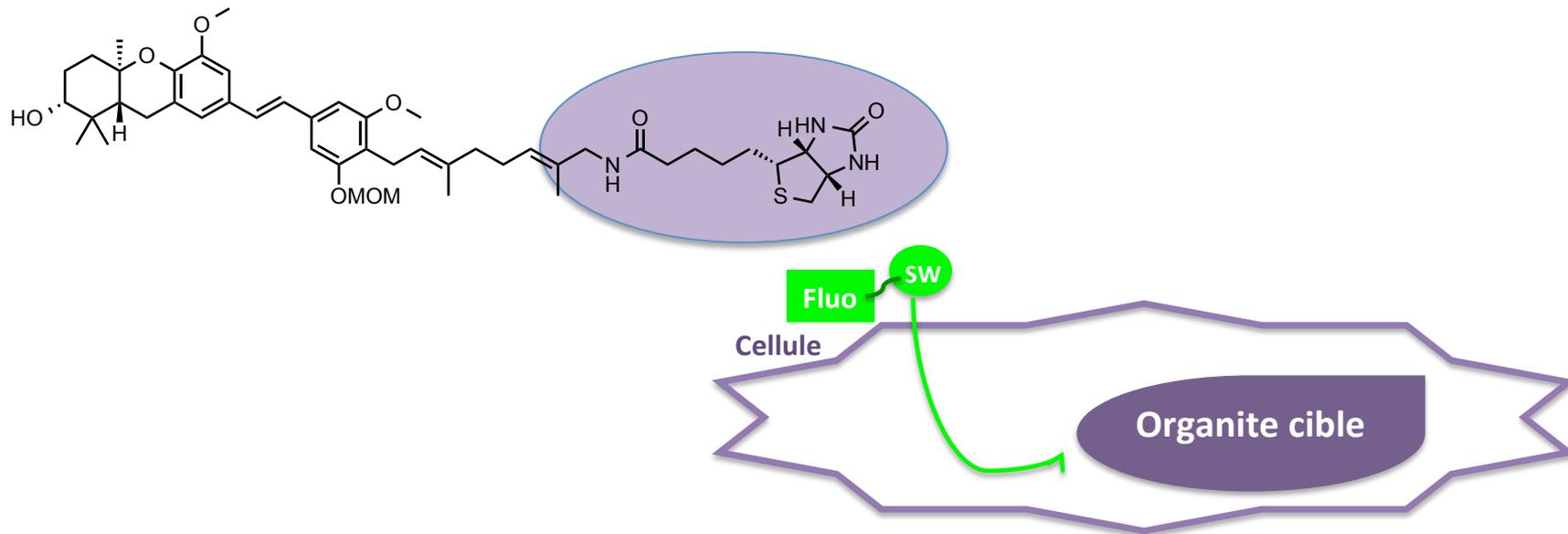
N. R. Mente *et al.* *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7963

J. J. Topczewski *et al.* *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6965

J. J. Topczewski *et al.* *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 1628

# Etat de l'art et problématiques

- Une **synthèse totale**, nombreuses étapes (16 à 22) / rendement global faible (<1%)
- Relations **S**tructure **A**ctivité
- **Analogues biotinylés et fluorescents** synthétisés → recherche de la cible

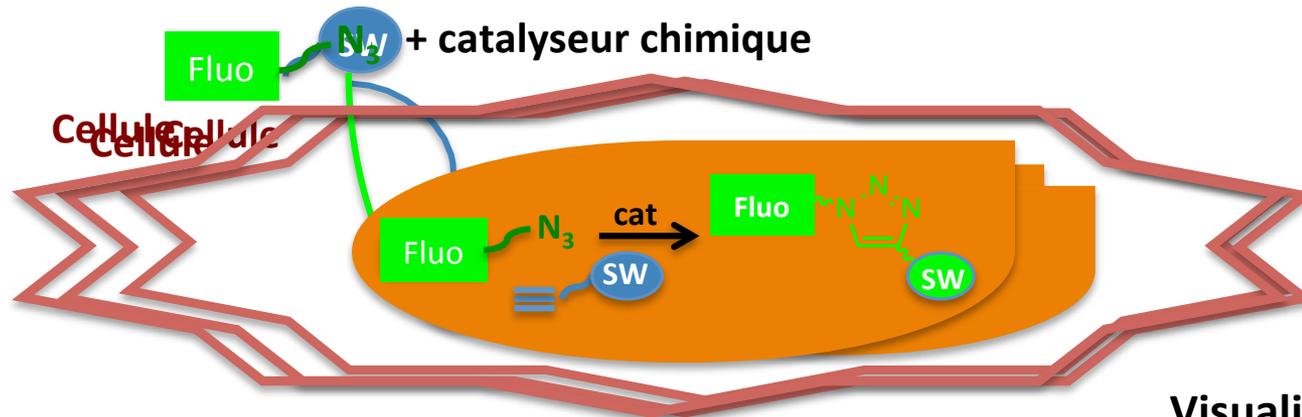


Problèmes d'encombrements → pénétration cellulaire / adressage à la cible  
Réduction de l'activité

# Objectifs du projet

- Rechercher de **nouveaux analogues** parmi 21 *Macaranga* spp.
- Isoler une **grande quantité de SWFs** à partir de *Macaranga tanarius* et **synthèse de nouveaux analogues actifs** portant un alcyne
- Étude de l'activité biologique et découverte du **mécanisme d'action**

➤ **Stratégie de chimie click *in cellulo*** Coll. J. Bignon (ICSN) et R. Rodriguez (Institut Curie)

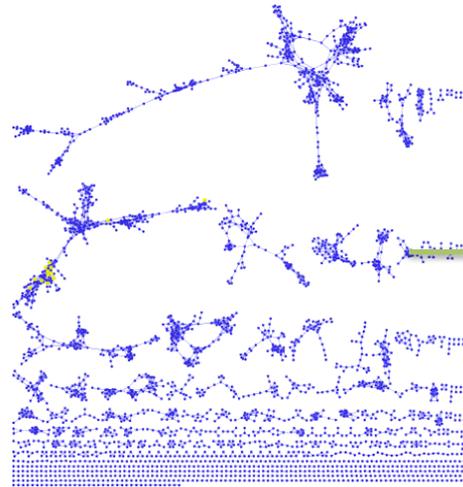
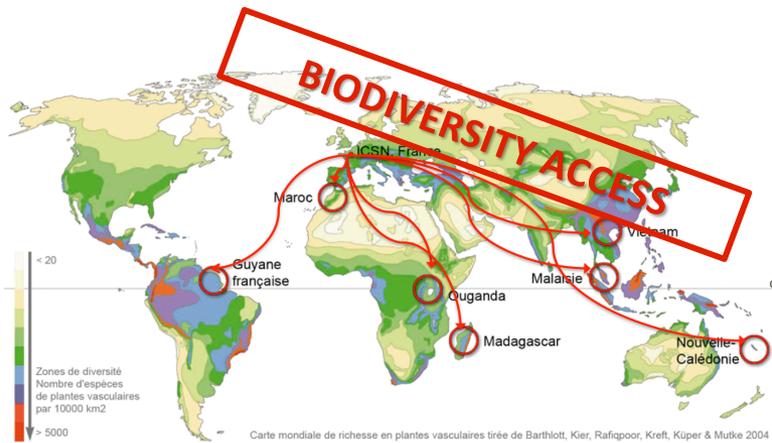


**Visualisation**  
**« Target fishing »**

# Exploration de la biodiversité des *Macaranga* spp.

Les «réseaux moléculaires», de puissants outils de déréplication

Collaboration avec Jean-Luc Wolfender, Université de Genève



Composés présents dans  
les fruits et les fleurs de  
deux *Macaranga*

## Extractothèque



21 *Macaranga* spp.

- ≠ pays
- ≠ parties de plantes

## Réseaux moléculaires



Analyses LC-MS<sup>2</sup>

plateforme GnPS  
Logiciel Cytoscape

# Exploration de la biodiversité des *Macaranga* spp.

SWFs dans feuilles et fruits de *Macaranga* spp.



(Photo : *Macaranga vedeliana* et *tanarius*)

**Présence de trichomes glandulaires à la surface  
des fruits et des feuilles**



**Organe de stockage (et biosynthèse) des SWFs ?**

# Exploration de la biodiversité des *Macaranga* spp.

SWFs dans feuilles et fruits de *Macaranga* spp.



Présence de trichomes glandulaires à la surface des fruits et des feuilles

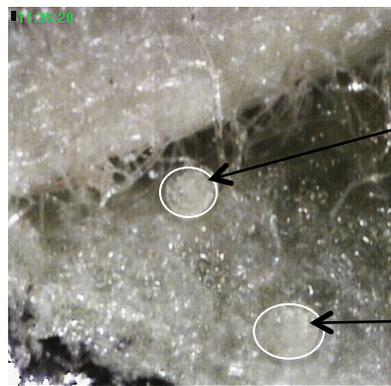


Organe de stockage (et biosynthèse) des SWFs ?

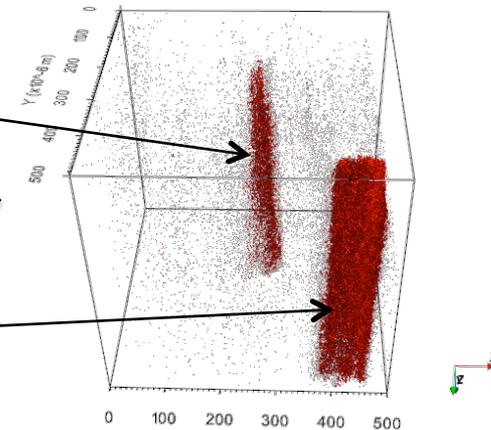
(Photo : *Macaranga vedeliana* et *tanarius*)

## Imagerie par spectrométrie de masse

Collaboration avec Nicolas Elie et Alain Brunelle (ICSN)



TOF-SIMS-GCIB



→ SWFs détectés spécifiquement au niveau des glandes

# Isolement d'une grande quantité de SWFs

50 kg de fruits *Macaranga tanarius*

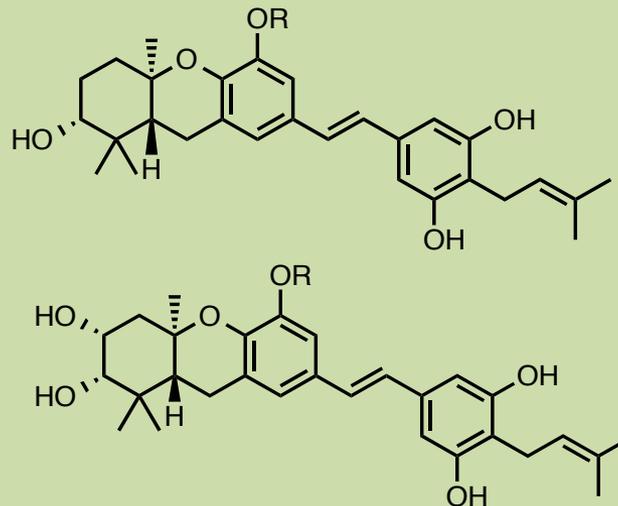


Extraction  
lavage éthanolique

LIA Vietnam

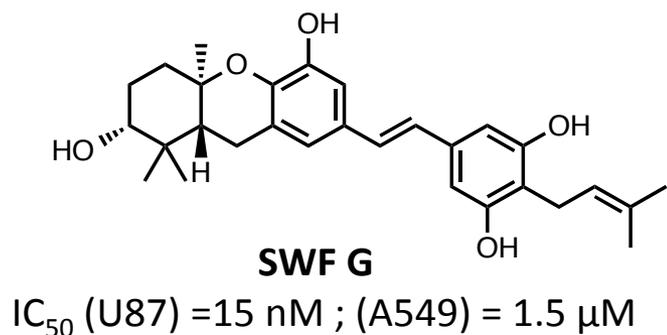
200 g d'extrait éthanolique

Composés désirés > 1 g

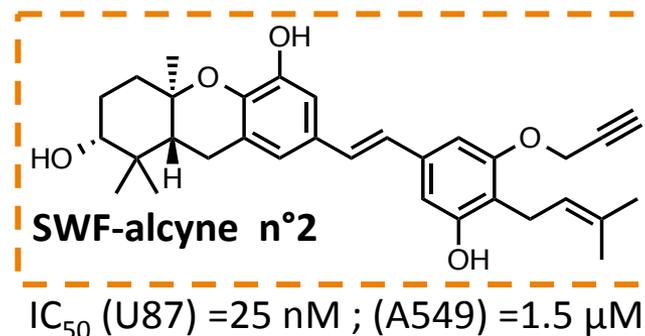


# Synthèse de dérivés alcyne à partir de la SWF G

- Développement d'une méthode de synthèse pour introduire régio-sélectivement un alcyne → **3 dérivés alcynes** ont été synthétisés sur la base des données de **RSA**



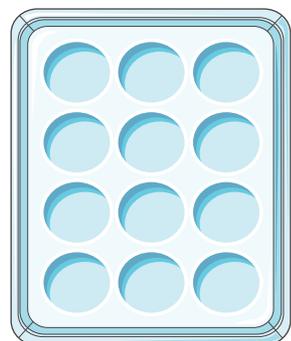
4 étapes



→ Même profil d'activité que la **SWF G**

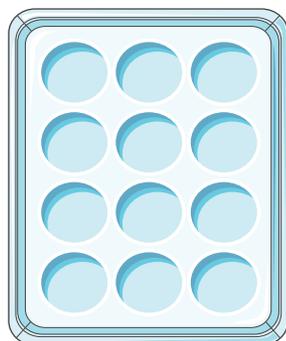
# Chimie click *in cellulo*

Collaboration avec Jérôme Bignon (ICSN) et  
Raphael Rodriguez, Institut Curie

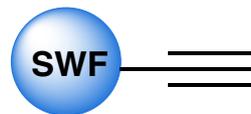
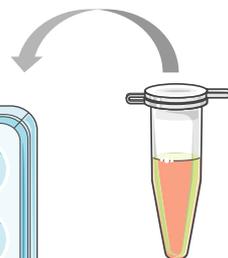


Culture cellulaire

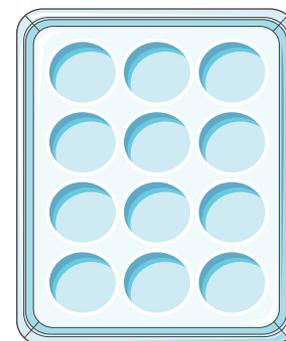
24 h



+ SWF-alcyne



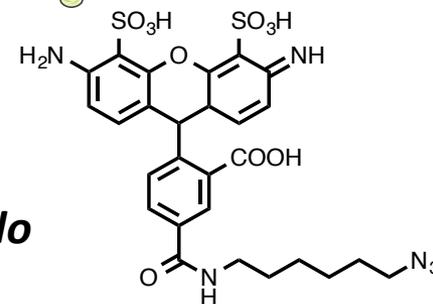
0 à 40 h



Fixation / perméabilisation



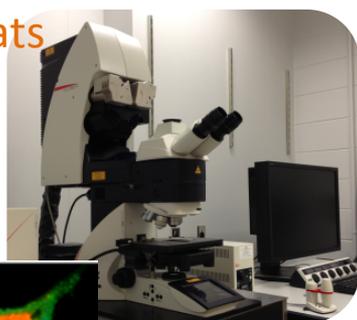
+ CuSO<sub>4</sub>  
**Alexa 488®**



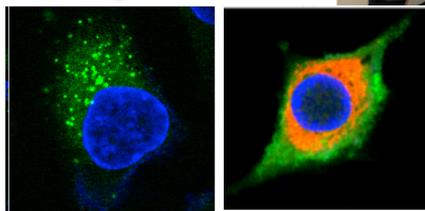
Chimie click *in cellulo*



Microscope confocal

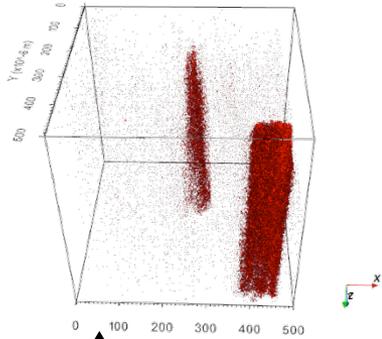


Analyse des résultats

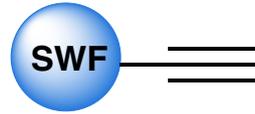


Chimie click *in cellulo*

# Conclusion et perspectives



TOF-SIMS-GCBI

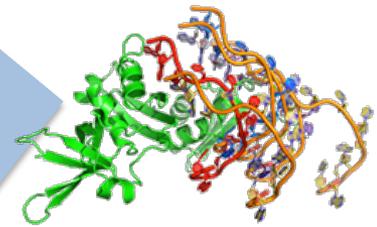


- Synthèse multi-étapes
- Addition sélective

Microscopie de fluorescence

Target fishing

Identification d'une nouvelle cible ?

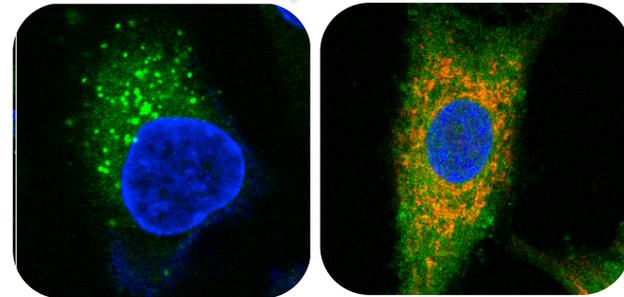
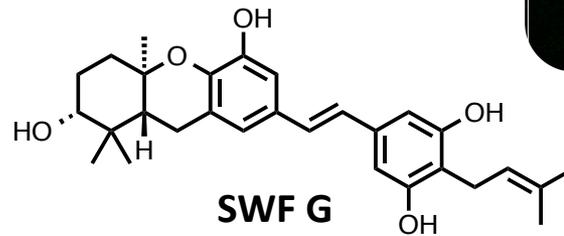


Exploration de la voie des OSBP

HS de dérivés alcynes

Grandes quantités de SWFs isolées

Détection d'un nouvel analogue



Stratégie de chimie click



Biodiversité  
Extractothèque

# Remerciements



Directrice : Dr Angela Marinetti

## Equipe métabolites de plantes Modélisation

- Marc Litaudon
- Vincent Dumontet
- Cécile Apel
- Sandy Desrat
- Florent Olivon
- Simon Remy
- Shelly Gupil
- Alma Abou Samra
- Tiphaine Peresse
- Gwenaëlle Jezequel

## Modélisation

- Dr Bogdan Iorga

## RMN

- Dr Eric Guittet

## Spectrométrie de masse

- Alain Brunelle

## Plateforme CIBI

- Jérôme Bignon



## LIA NATPROCHEMLAB

- Pham Van Cuong



- Dr Joëlle Wiels



- Bruno Antony



- Thierry Virolle



## LIA NATPROLAB

- Pr Khalijah Awang



- Jean-Luc Wolfender



- Raphaël Rodriguez

## Financements



# Equipe Métabolites de Végétaux

isolement, synthèse et bioactivité



**Merci pour votre attention**