

Développement d'un test enzymatique sur couche mince pour accélérer la découverte d'anti-inflammatoires

Aurélie URBAIN

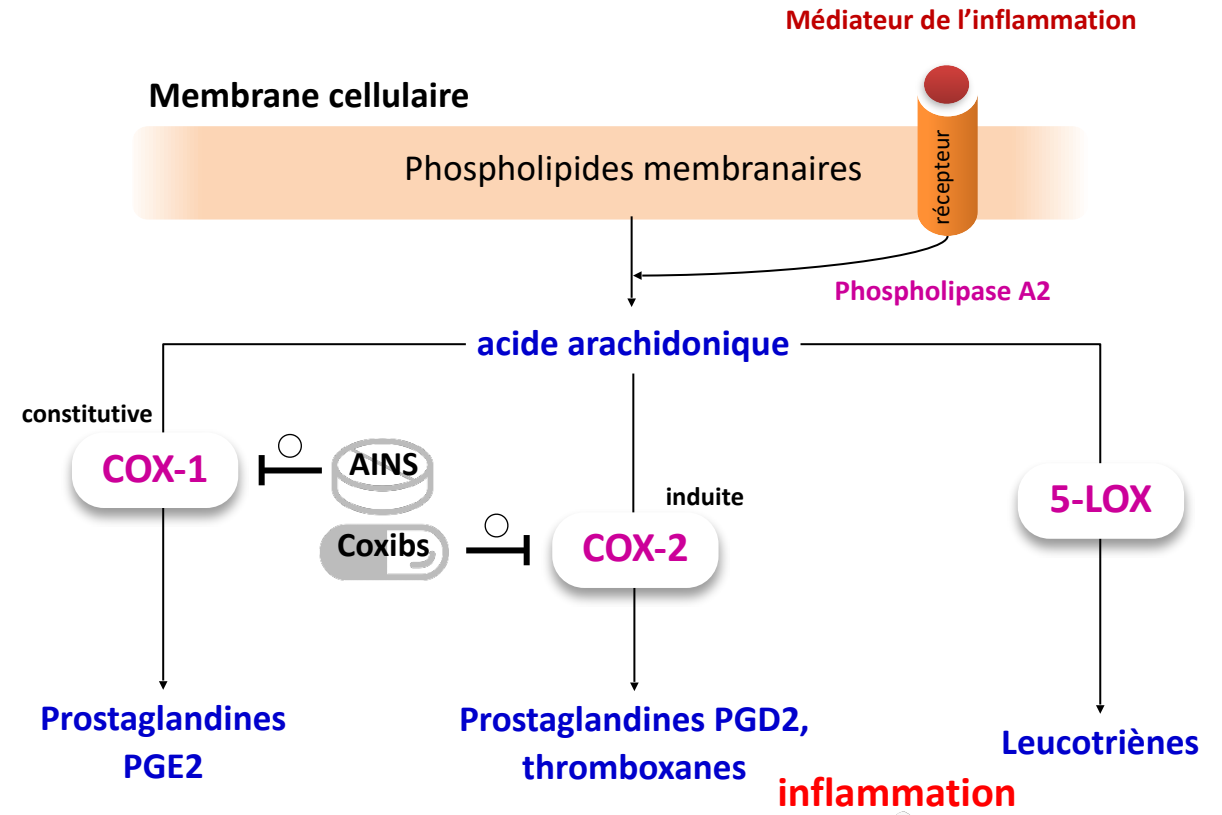
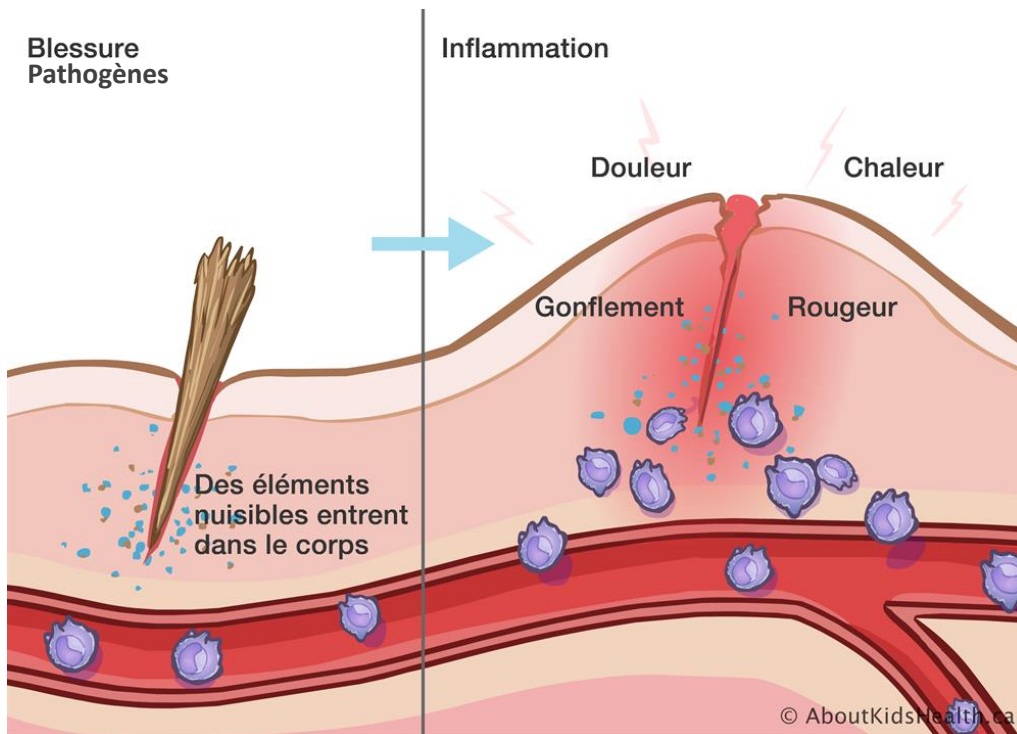
Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178

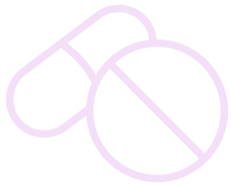
Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie

urbain@unistra.fr

L'inflammation

Un mécanisme de défense nécessaire mais désagréable





Les anti-inflammatoires



Effets indésirables

- troubles digestifs, ulcères
- hypertension artérielle
- éruptions cutanées
- crises d'asthme

Contre-indications

- ulcères
- MICI
- trouble de la coagulation
- insuffisance hépatique et rénale
- Infections non contrôlées
- hypertension artérielle sévère

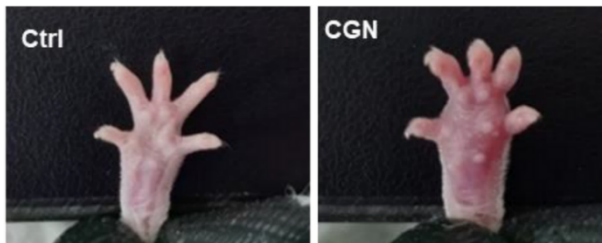
Interactions

- antihypertenseurs
- corticoïdes
- cardiotoniques
- diurétiques

La détection de composés anti-inflammatoires

In vivo

- Œdème induit sur patte de rongeur
- Arthrite induite



In vitro

- Détection de médiateurs
 - ✓ Histamine
 - ✓ Cytokines : IL, TNF- α ...
 - ✓ Chimioquinas
 - ✓ NO, ROS
 - ✓ Leucotriènes, prostaglandines...
- Tests enzymatiques
 - ✓ Cyclooxygénases
 - ✓ Phospholipases
 - ✓ Lipoxygénases

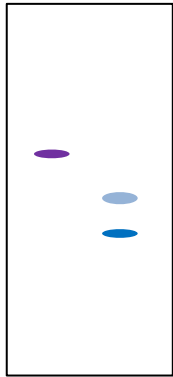




Objectif : développer un test sur couche mince

01

Mise en contact des échantillons sur la couche mince

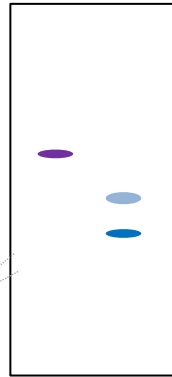


séchage



02

Application de l'enzyme



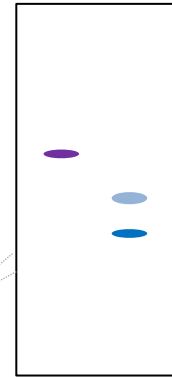
COX

Incubation



03

Application des réactifs chromogéniques



substrat
+ réactif

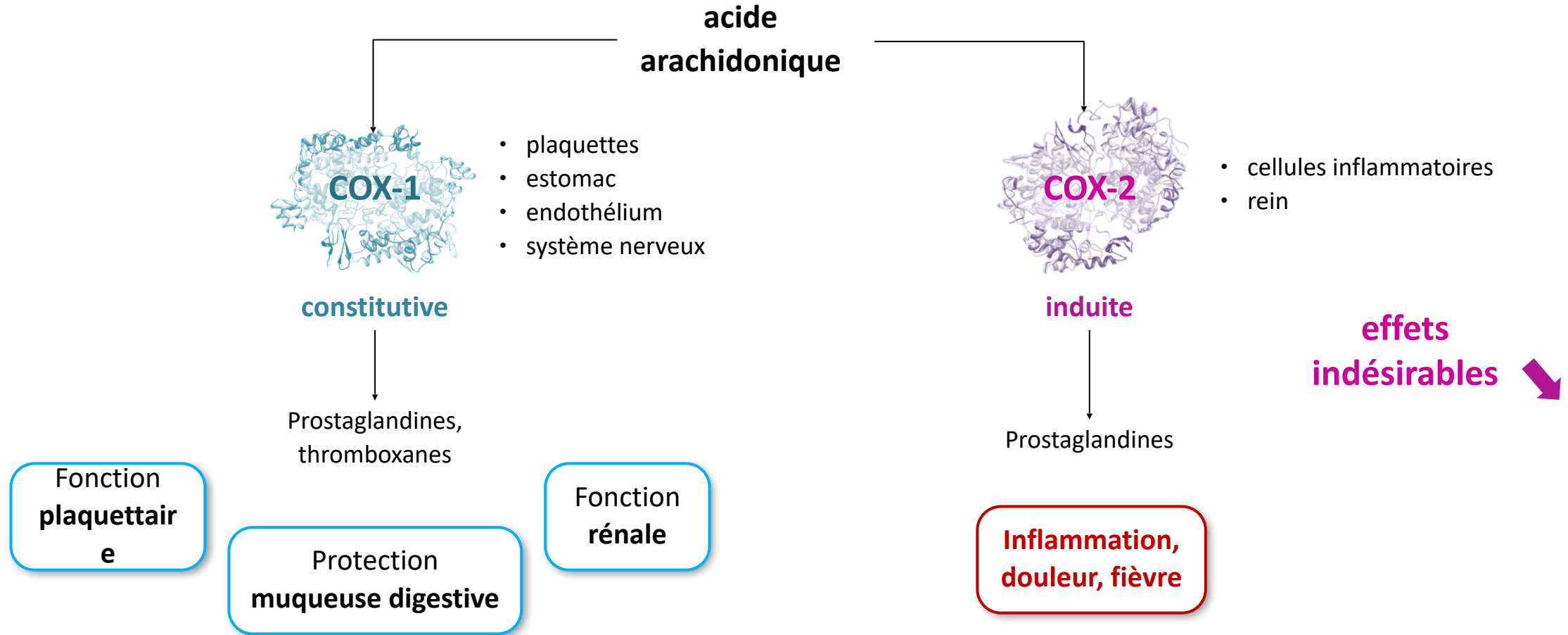


04

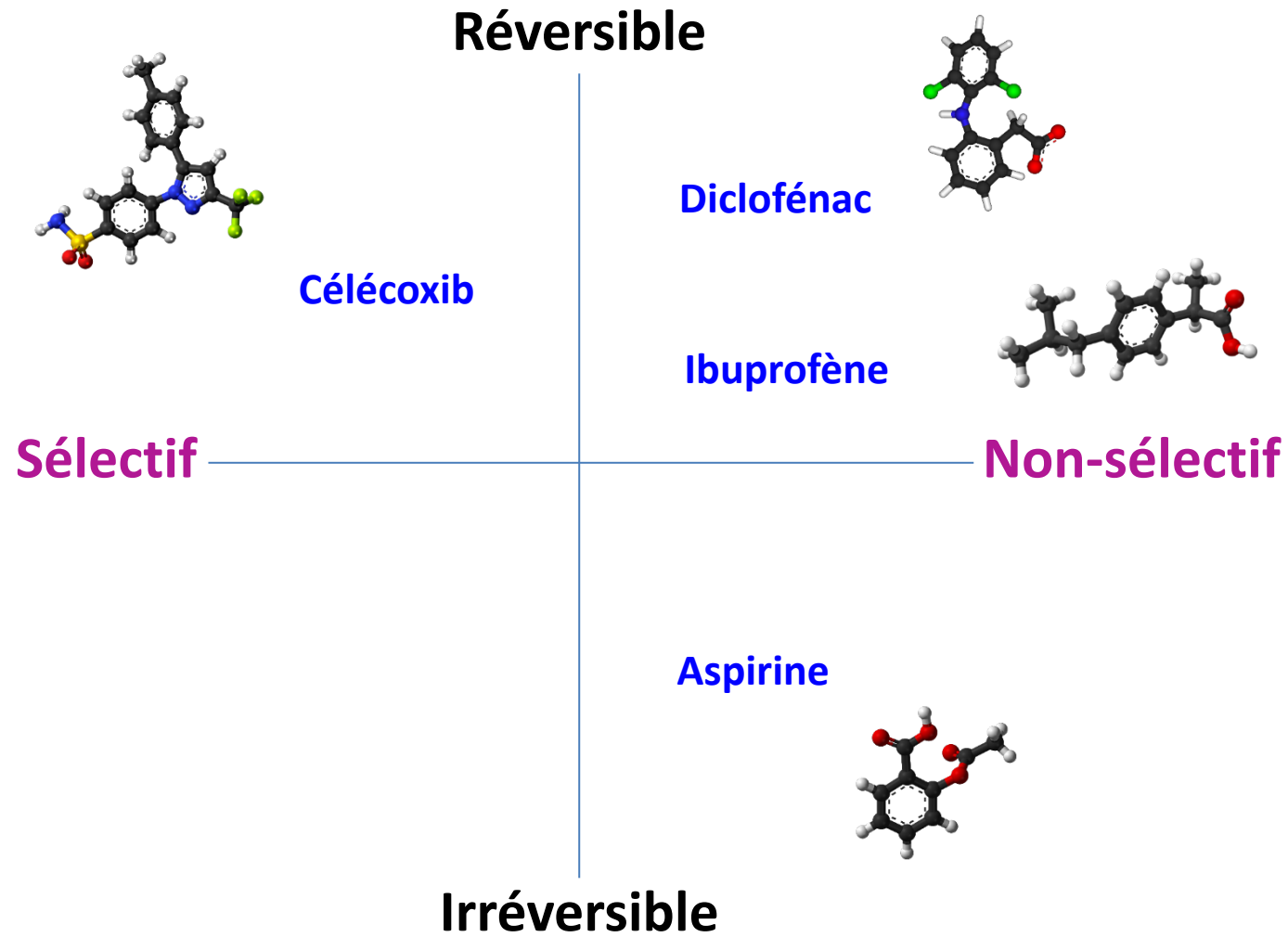
Analyse



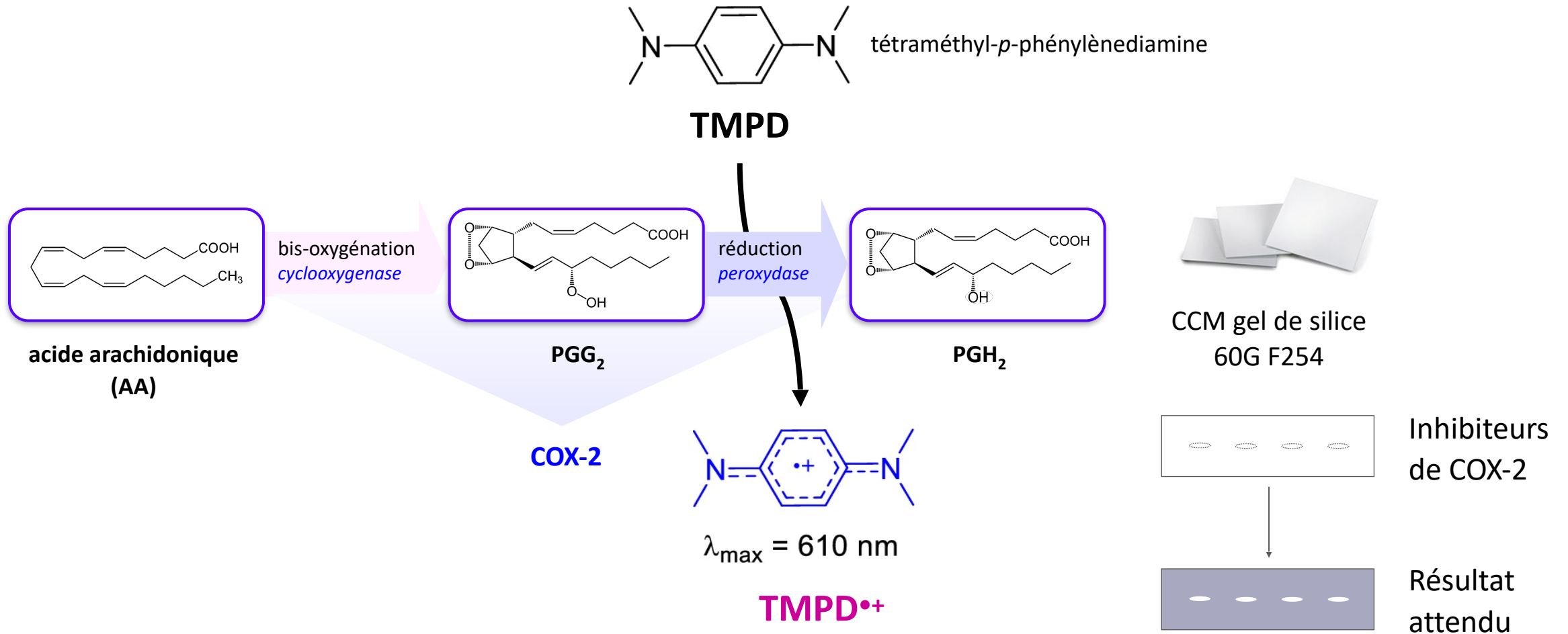
01 Choix de l'enzyme cible et des inhibiteurs



01 Choix de l'enzyme cible et des inhibiteurs



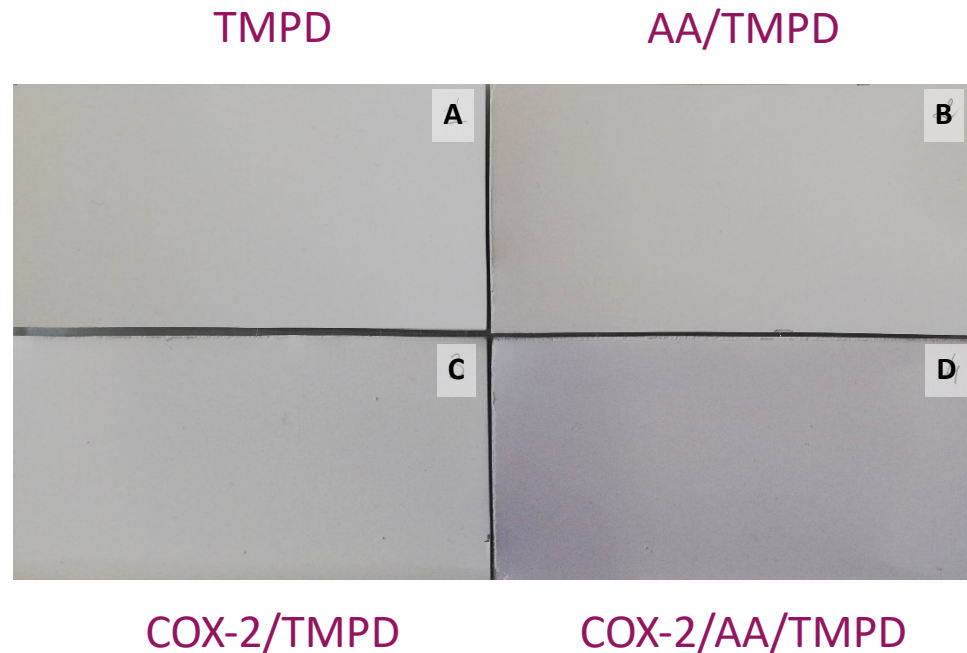
02 Choix du réactif chromogénique et du support



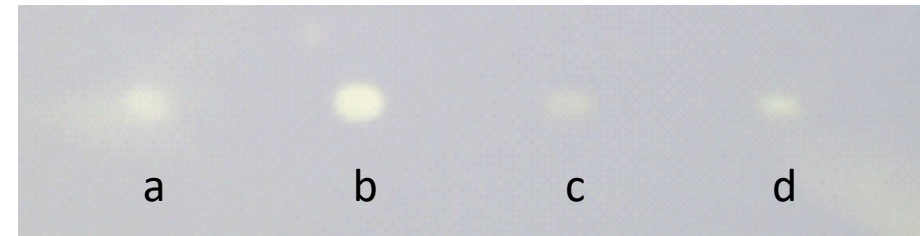
03 Preuve de concept

Paramètres initiaux

- Plaques CCM gel de silice 60 F₂₅₄
- COX-2 : 8 U/mL
- Acide arachidonique : 1 mM
- TMPD : 2 mM
- Incubation 10 min à 37 °C



Test avec 4 inhibiteurs de COX (50 µg)



- Célécoxib
- Ibuprofène
- Aspirine
- Diclofénac

04 Optimisation des paramètres

COX-2 (UE/mL)	Acide arachidonique	TMPD	Ratio	Coloration	
1	1 μ M	50 μ M	1:50	Pas de coloration	
	1 μ M	200 μ M	1:200	Coloration faible	
	10 μ M	200 μ M	1:20	Gris mauve clair	
	10 μ M	500 μ M	1:50	Gris	
	10 μ M	2 mM	1:200	Mauve	
	5 mM	1 mM	5:1	Bleu gris	
	10 mM	2 mM	1:2	Gris	

Meilleur compromis
contraste / coût

Conditions retenues

Concentrations finales dans le mélange réactionnel :

- Acide arachidonique 5 μ M
- TMPD 1 mM

Coût en réactifs par plaque 10 x 20 cm

- Plaque CCM 64 cts
- COX-2 1,20 €
- TMPD 1,80 €
- AA 1 ct
- Autres coûts négligeables

Total :

3,65 € par plaque



Coût des kits commerciaux

COX-2 inhibitor screening kit

Sigma-Aldrich

411 €

The assay is based on the **fluorometric** detection of prostaglandin G2, the intermediate product generated by the COX enzyme.

COX Activity Assay Kit

Cayman

658 €

The COX activity assay utilizes the peroxidase component of cyclooxygenases. The peroxidase activity is assayed colorimetrically by monitoring the appearance of oxidized **TMPD** at 590 nm.

Human COX 2 ELISA Kit

Biomatik

666 €

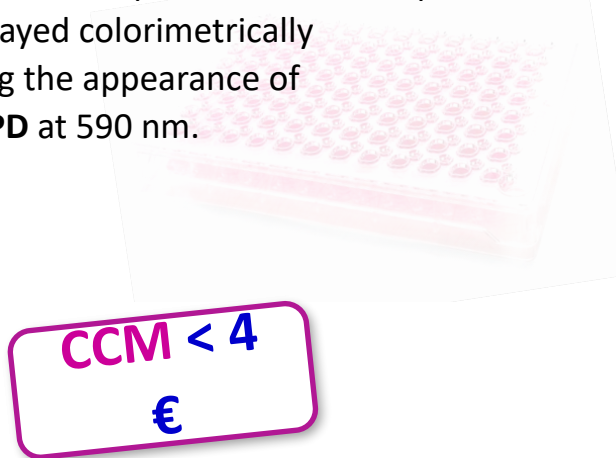
The kit is a sandwich enzyme **immunoassay** for the in vitro quantitative measurement of COX 2.

COX activity kit

Enzo

465 €

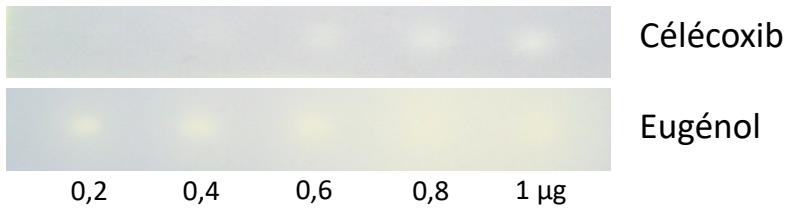
The COX activity kit uses a specific **chemiluminescent** substrate to detect the peroxidative activity of COX enzymes.



**CCM < 4
€**

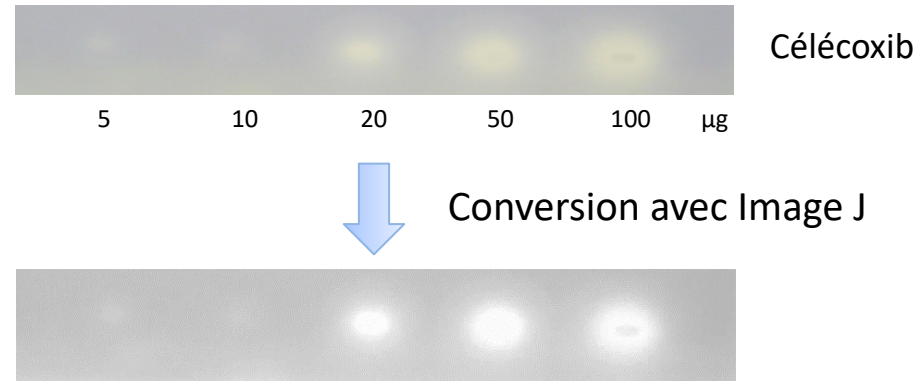
05 Sensibilité et linéarité

Sensibilité

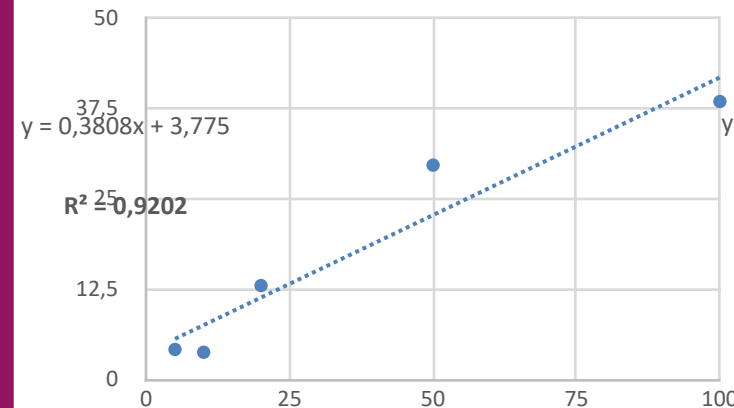


Inhibiteur	LOD (µg)	LOD (nmole)
célécoxib	0,4	1,05
diclofénac	0,6	2,03
ibuprofène	0,2	0,97
aspirine	0,1	0,56

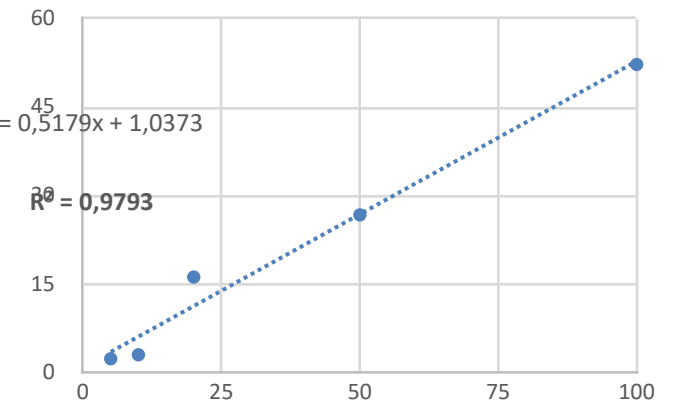
Linéarité



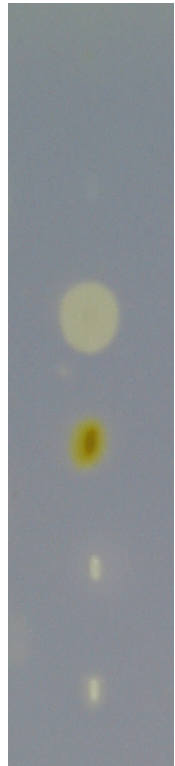
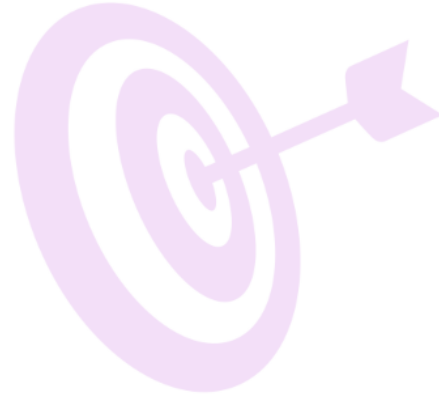
Linéarité pour le célécoxib



Linéarité pour le diclofénac



06 Sélectivité



Caféine

Coumarine

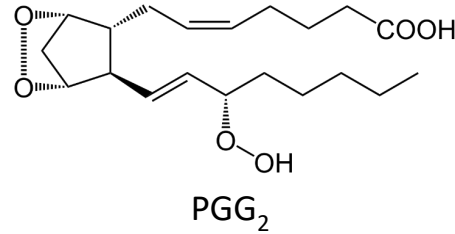
Acide ascorbique

Quercétine

Sitostérol

Acide bétulinique

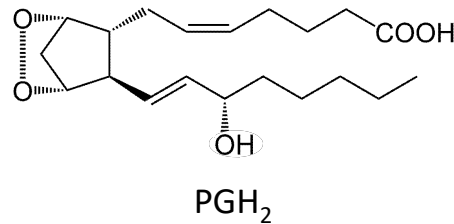
50 µg



PGG₂

TMPD
oxydation

TMPD^{•+}



PGH₂

Risque de faux positif avec les antioxydants?



06 Sélectivité



Inhibiteurs de référence	CXB	CXB	DCF	DCF	IBP	IBP	AAS	ASS	AS	AS	EU	EU
Flavonoïdes	EGCG	quercetin	quercetol	kampferol	myricetin	naringin	rutin	vitexin	taxifolin	lilioside	ononin	cyanidin
Autres phénoliques	proto-catechuic acid	arbutine	tyrosol	rosmarinic acid	resveratrol	procyanidin A2	procyanidin B1	procyanidin B2	aloin A	lawsone	psoralen	scopoletin
Mono, sesqui, diterpènes	anethol	borneol	eucalyptol	menthol	carvacrol	sabinene	farnesene	α -humulene	trans-caryophyllene	santonin	parthenolide	ginkgolide A
Triterpènes et stérols	campesterol	β -sitosterol	stigmasterol	lupeol	uvaol	betulin	betulic acid	madecassic acid	α -hederin	ginsenoside Rd	α -tocopherol	astaxanthin
Alcaloïdes et autres	caffeine	piperine	capsaïcine	quinine bromhydrate	tomatin	senecionin	lobeline sulfate	taurine	L-carnitine	glucobrassicin	sinigrin	

CXB : célécoxib; DCF : diclofénac ; IBP : ibuprofène ; AAS : aspirine ; AS : acide salicylique ; EU : eugénol

06 Sélectivité

Test d'inhibition de la COX-2 (20 µg)

Inhibiteurs de référence	CXB	CXB	DCF	DCF	IBP	IBP	AAS	ASS	AS	AS	EU	EU
Flavonoïdes	EGCG	quercetin	quercetol	kampferol	myricetin	naringin	rutin	vitexin	taxifolin	lilioside	ononin	cyanidin
Autres phénoliques	protocatechuic acid	arbutine	tyrosol	rosmarinic acid	resveratrol	procyanidin A2	procyanidin B1	procyanidin B2	aloin A	lawsone	psoralen	scopoletin
Mono, sesqui, diterpènes	anethol	borneol	eucalyptol	menthol	carvacrol	sabinene	farnesene	α-humulene	trans-caryophyllene	santonin	parthenolide	ginkgolide A
Triterpènes et stérols	campesterol	β-sitosterol	stigmasterol	lupeol	uvaol	betulin	betulinic acid	madecassic acid	α-hederin	ginsenoside Rd	α-tocopherol	astaxanthin
Alcaloïdes et autres	caffeine	piperine	capsaïcine	quinine	tomatin	senecionin	lobeline	taurine	L-carnitine	glucobrassicin	sinigrin	

CXB : célécoxib; DCF : diclofénac ; IBP : ibuprofène ; AAS : aspirine ; AS : acide salicylique ; EU : eugénol

06 Sélectivité

Test antioxydant au DPPH (20 µg)

Inhibiteurs de référence	CXB	CXB	DCF	DCF	IBP	IBP	AAS	ASS	AS	AS	EU	EU
Flavonoïdes	EGCG	quercetin	quercetol	kampferol	myricetin	naringin	rutin	vitexin	taxifolin	lilioside	ononin	cyanidin
Autres phénoliques	protocatechuic acid	arbutine	tyrosol	rosmarinic acid	resveratrol	procyanidin A2	procyanidin B1	procyanidin B2	aloin A	lawsone	psoralen	scopoletin
Mono, sesqui, diterpènes	anethol	borneol	eucalyptol	menthol	carvacrol	sabinene	farnesene	α-humulene	trans-caryophyllene	santonin	parthenolide	ginkgolide A
Triterpènes et stérols	campesterol	β-sitosterol	stigmasterol	lupeol	uvaol	betulin	betulinic acid	madecassic acid	α-hederin	ginsenoside Rd	α-tocopherol	astaxanthin
Alcaloïdes et autres	caffeine	piperine	capsaïcine	quinine	tomatin	senecionin	lobeline	taurine	L-carnitine	glucobrassicin	sinigrin	

CXB : célécoxib; DCF : diclofénac ; IBP : ibuprofène ; AAS : aspirine ; AS : acide salicylique ; EU : eugénol

06 Sélectivité

Received: 25 January 2021 | Revised: 12 August 2021 | Accepted: 1 September 2021
DOI: 10.1002/jbt.22917

Betulinic acid exerts antigenotoxic and anticarcinogenic activities via inhibition of COX-2 and PCNA in rodents

Natália H. Ferreira | Nayanne L. Cunha | Matheus R. S. de Melo |
Fernanda S. Fernandes | Karoline S. de Freitas | Samuel do Nascimento |
Arthur B. Ribeiro | Márcio L. de A. e Silva | Wilson R. Cunha | Denise C. Tavares

Compound	COX-2 Inhibition	
betulinic acid	+	
madecassic acid	+	
α-hederin	+	
ginsenoside Rd	+	-
sabinene	+	-
parthenolide	+	-
campesterol	+	-
β-sitosterol	+	-
quinine	+	-
stigmasterol	±	-
lupeol	±	-
uvaol	±	-
piperine	±	-
aloin A	±	-
psoralen	±	-
ascorbic acid	+	+
capsaicin	+	+

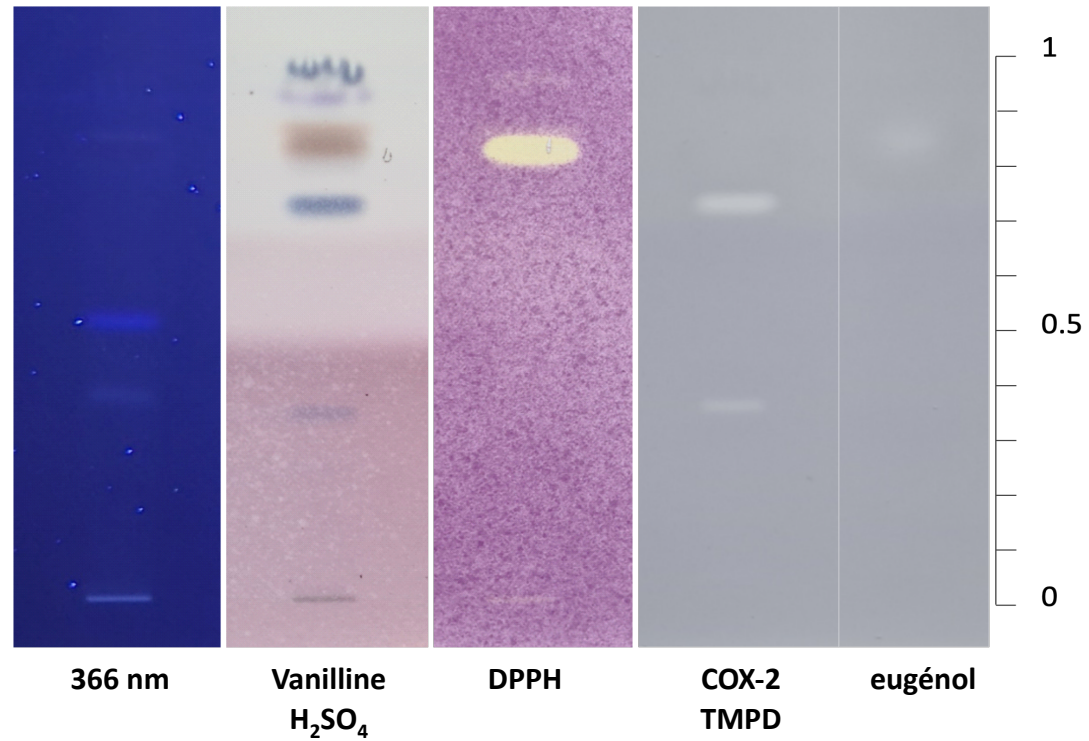
Compound	COX-2 Inhibition	Antioxidant Activity
taurine	-	-
L-carnitine	-	-
glucobrassicin	-	-
sinigrin	-	-
astaxanthin	-	-
caffeine	-	-
anethol	-	-
borneol	-	-
eucalyptol	-	-
menthol	-	-
farnesene	-	-
α-humulene	-	-
trans-caryophyllene	-	-
santonin	-	-
ginkgolide A	-	-
betulin	-	-

Compound	COX-2 Inhibition	Antioxidant Activity
epicatechin gallate	-	+
quercetin	-	+
quercetol	-	+
kampferol	-	+
myricetin	-	+
rutin	-	+
taxifolin	-	+
protocatechuic acid	-	+
arbutin	-	+
rosmarinic acid	-	+
resveratrol	-	+
procyanidin A2	-	+
procyanidin B1	-	+
procyanidin B2	-	+
scopoletin	-	+
carvacrol	-	+
α-tocopherol	-	+
naringin	-	±
vitexin	-	±
lilioside	-	±
tyrosol	-	±
lawsone	-	±
cyanidin	nd	nd

07 Application à des extraits complexes



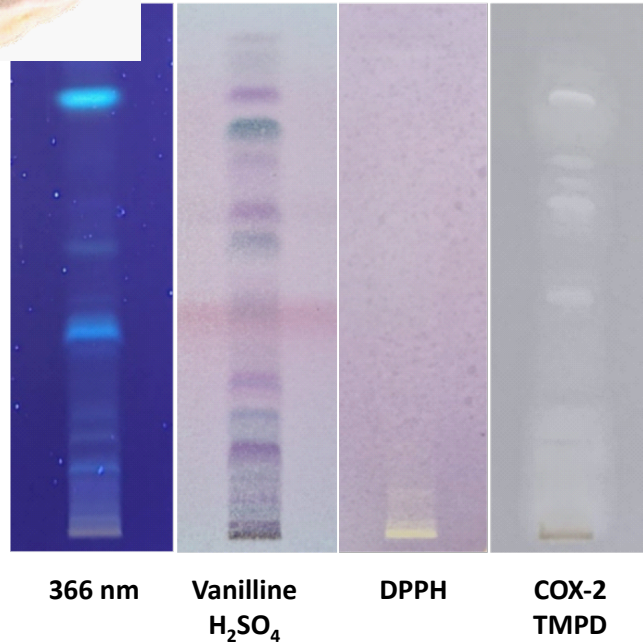
Extrait AcOEt de
clou de girofle



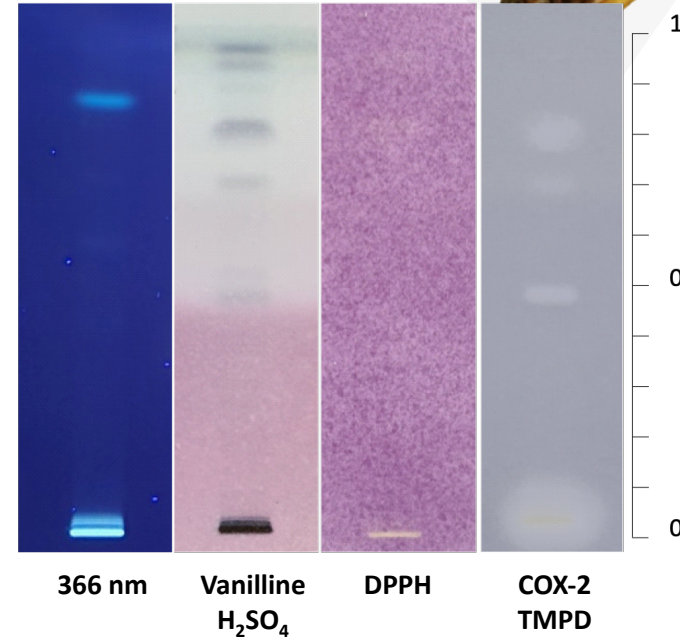
07 Application à des extraits complexes



Extrait AcOEt de
Fomitopsis pinicola



Extrait AcOEt
d'*Hypholoma fasciculare*



Bilan

- 
- ✓ Test simple
 - ✓ Rapide
 - ✓ Peu coûteux
 - ✓ Fiable
 - ✓ Sensible
 - ✓ Sélectif
 - ✓ Informatif
 - ✓ Adaptable
 - ✓ Transposable en HPTLC

Mais attention à :

- ✓ utiliser des solutions **fraîchement préparées**
- ✓ la qualité du **DMSO** pour les solutions mères

Pour plus d'infos :



separations

an Open Access Journal by MDPI

Development of an Enzyme-Based Thin-Layer Chromatographic Assay
for the Detection of Cyclooxygenase-2 Inhibitors

Aurélie Urbain; Nidhal Trabelssi; Valérie Bardot

Separations 2022, Volume 9, Issue 9, 238

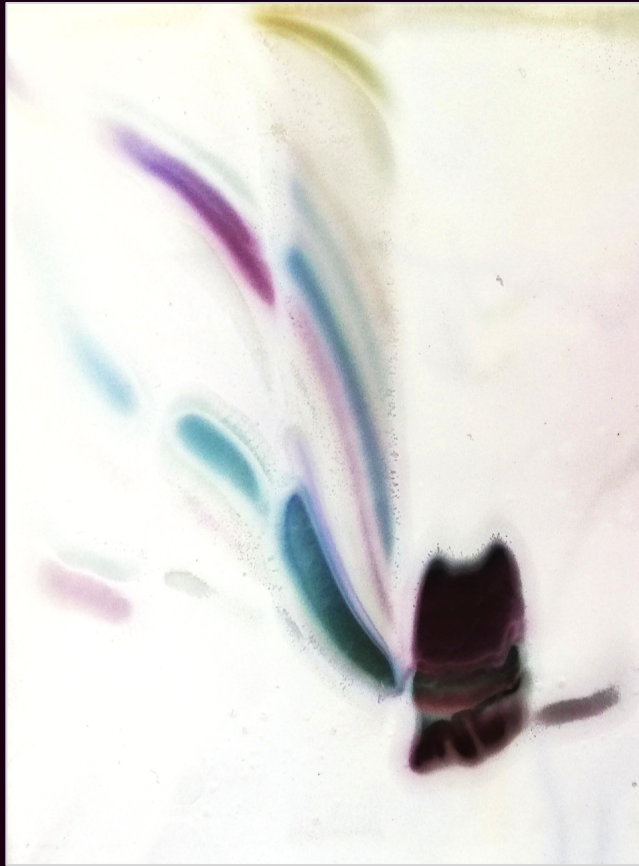


Valérie Bardot

Nidhal Trabelssi

Rodolphe Gantzer

Sara Hernández Melgar



CCM d'un étudiant de L3



Note technique 2

Note artistique 10

