



HAL
open science

**Les diterpènes d'euphorbiaceae : origine biosynthétique
et intérêts pharmaceutiques : étude de sandwithia
guyanensis**

Simon Remy

► **To cite this version:**

Simon Remy. Les diterpènes d'euphorbiaceae : origine biosynthétique et intérêts pharmaceutiques : étude de sandwithia guyanensis. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931841

HAL Id: hal-01931841

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931841>

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE 2017

FACULTE DE PHARMACIE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

Le **29 septembre 2017**, sur un sujet dédié à :

**LES DITERPÈNES D'EUPHORBIACEAE : ORIGINE BIOSYNTHÉTIQUE
ET INTÉRÊTS PHARMACEUTIQUES**

—
ÉTUDE DE *SANDWITHIA GUYANENSIS*

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Simon REMY

né le 6 octobre 1991 à Verdun

Membres du Jury

Président :	Mme. Dominique Laurain-Mattar,	Professeur, Université de Lorraine
Juges :	M. Marc Litaudon, M. Frédéric Bourgaud, Mme. Rosella Spina,	Ingénieur de recherche, ICSN-CNRS Professeur, Directeur scientifique de PAT Maître de conférences, Université de Lorraine

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Gabriel TROCKLE

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

✠ En attente de nomination

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

Serment Des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, dans l'équipe Métabolites de Végétaux dirigée par Madame Fanny Roussi sous la direction de Monsieur Marc Litaudon.

À Monsieur M. Litaudon qui m'a donné ma chance lors du stage de master 2 et m'a permis de poursuivre en thèse de doctorat sous sa direction. Au travers de ses précieux conseils et de ses encouragements, il a su orienter efficacement mon travail. Qu'il reçoive ma profonde reconnaissance.

À Madame le Professeur D. Laurain-Mattar qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse. Ses enseignements tout au long de mon cursus et son accompagnement lors de mon premier stage de recherche m'ont permis de découvrir la pharmacognosie et le monde des plantes. Qu'elle trouve ici toute ma gratitude.

À Monsieur le Professeur F. Bourgaud dont les travaux me fascinent et qui a accepté de bien vouloir juger ce travail. Qu'il reçoivent ici le témoignage de mon profond respect et mes remerciements sincères.

À Madame R. Spina. Sa patience et sa bienveillance au laboratoire lors de mon premier stage de recherche m'ont permis de prendre confiance en moi et d'acquérir des bases solides en phytochimie. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

À Monsieur F. Olivon pour sa contribution à l'accomplissement de cette thèse. Sa formation précise et efficace m'a permis de mener l'étude phytochimique de *S.guyanensis* dans les meilleures conditions. Qu'il trouve ici tous mes remerciements.

Je remercie vivement tous ceux qui m'ont apporté leur aide au cours de mes recherches :

Madame F. Roussi pour l'intérêt porté à l'ensemble de mes travaux, son soutien et ses encouragements réguliers.

Monsieur S. Desrat pour son aide à la réalisation des hypothèses biosynthétiques, sa gentillesse et sa disponibilité.

Madame C. Apel pour ses précieux conseils au laboratoire de phytochimie.

Monsieur D. Touboul pour les analyses de spectrométrie de masse et sa formation efficace.

Monsieur F. Blanchard et Monsieur P. Retailleau pour la réalisation des analyses cristallographiques.

Monsieur J.F. Gallard pour la réalisation des spectres RMN.

Madame V. Eparvier pour la récolte de *S. guyanensis*.

L'équipe du Professeur P. Leyssen pour la réalisation des tests biologiques.

Le Labex CEBA pour son soutien financier «Investissement d'Avenir» de l'Agence National de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01)

Je remercie également Monsieur le Professeur A. Nicolas, Monsieur le Professeur G. Karcher, Madame C. Collet, Monsieur N. Véran, Madame A. Clément et toute l'équipe de Nancyclotep pour leur accueil chaleureux durant mon stage hospitalo-universitaire.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel ; leur sagesse m'apaise et m'a permis de prendre du recul dans les moments difficiles. Je remercie mon frère Armand pour sa patience et sa capacité d'écoute. Je remercie ma soeur Kelly pour sa joie de vivre communicative et sa profonde gentillesse. Je remercie mes amis pour leur soutien. Enfin, je remercie mon binôme devenu ma compagne, Caroline pour son amour, sa douceur et sa patience au quotidien.

Avant-propos

L'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) est l'un des plus grands centres de recherche en chimie de France. Il est situé sur le campus du centre de recherche de Gif-sur-Yvette. L'ICSN emploie près de 130 personnes, chercheurs, étudiants, post-doctorants, techniciens et administratifs. Ses domaines d'activités portent sur tous les aspects de la chimie des substances naturelles (extraction, détermination structurale, synthèse, chimie exploratoire et méthodologies) mais également sur leurs interactions avec le vivant (activité biologique, relation structure-activité, biologie structurale). Cet environnement propice aux interactions a permis la découverte de deux médicaments majeurs en thérapie anticancéreuse, le Taxotère[®] et la Navelbine[®].

Pour valoriser la biodiversité dans un but thérapeutique, l'équipe Métabolites de Végétaux dirigée par le Dr. Fanny Roussi, peut s'appuyer sur des structures internes (extractothèque, plateforme d'évaluation biologique) mais également sur de nombreuses collaborations nationales et internationales, pour la prospection, la collecte des plantes ou les études biologiques (Figure 1). L'équipe est chargée de la valorisation d'une banque d'extraits naturels préparés à partir de plantes supérieures provenant de zones riches en biodiversité. Les plantes sont récoltées, identifiées, séchées, broyées et extraites avant d'être envoyées à l'ICSN. Les échantillons sont répartis dans des plaques multi-puits afin d'être criblés sur différentes cibles biologiques. L'extractothèque de l'ICSN rassemble ainsi plus de 14 000 extraits préparés à partir de 6500 plantes. Au sein de cette équipe, le laboratoire de phytochimie tra-

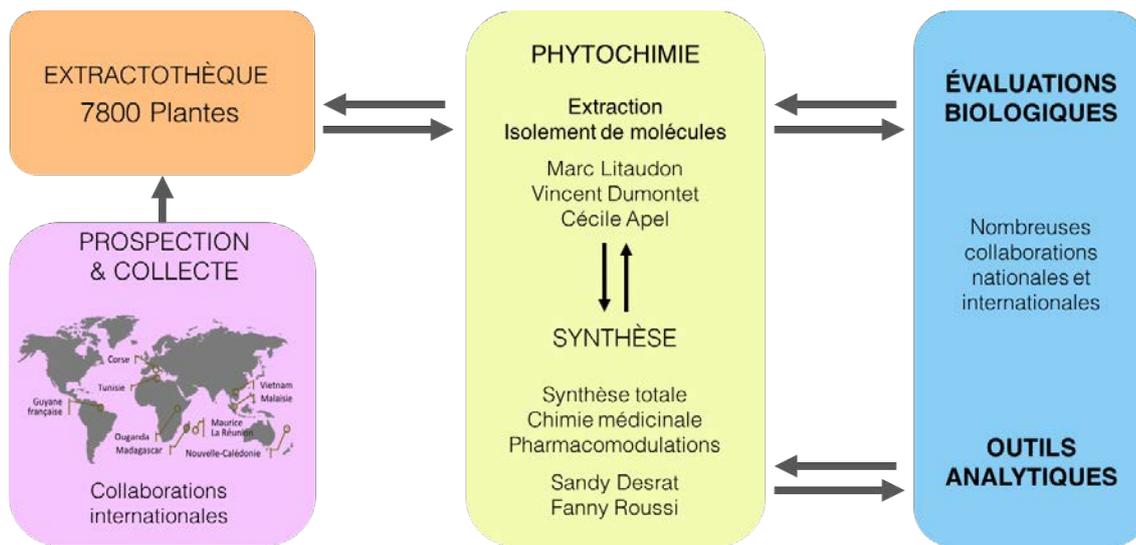


FIGURE 1 – Organigramme de l'équipe Métabolites de Végétaux : Isolement, Synthèse et Bioactivité

vaile en interdépendance avec le laboratoire de synthèse pour permettre l'émergence de projets, allant de l'isolement d'une molécule à sa synthèse, en passant par la mise en place d'études de relations structure-activité et de pharmaco-modulation.

Sommaire

I	Partie bibliographique	5
1	La famille botanique des Euphorbiaceae	7
1.1	Classification et distribution	7
1.2	L'appareil reproducteur	9
1.3	L'appareil végétatif	10
1.4	Les laticifères	10
2	Origine des diterpènes macrocycliques	13
2.1	Les métabolites précurseurs	14
2.2	Les voies de biosynthèse	17
2.2.1	Les cembranes et les casbanes	17
2.2.2	Les lathyranes et leurs dérivés	20
2.2.3	Les jatrophanes et leurs dérivés	22
2.2.4	Les phorboïdes et leurs dérivés	24
3	Intérêts des diterpènes macrocycliques	33
3.1	Activité anti-"Multi-Drug-Resistance"	33
3.2	Activité modulatrice des PKCs	35
3.2.1	Le TPA	36
3.2.2	La prostratine	37
3.2.3	Autres squelettes antiviraux	37
3.2.4	L'ingénol mébutate	38

3.2.5	l'EBC 46	39
3.3	Autres activités	41
II Travaux personnels : étude phytochimique de <i>Sandwithia guyanensis</i>		43
1	Description et intérêt de <i>S.guyanensis</i>	45
1.1	Le genre <i>Sandwithia</i>	45
1.2	Activité antivirale de l'extrait de <i>S.guyanensis</i>	46
2	Les diterpènes de <i>S.guyanensis</i>	47
2.1	Extraction et purification	47
2.2	Caractérisation structurale	49
2.2.1	Composés 1 à 3	49
2.2.2	Composés 4 à 7	51
2.2.3	Composés 8 à 11	55
2.2.4	Composés 12 à 17	56
2.3	Activités biologiques des diterpènes isolés	66
3	Hypothèses biosynthétiques	69
3.1	Les phénanthrènes	69
3.2	Les euphoractanes	70

<i>SOMMAIRE</i>	xvii
III Discussion et conclusion	73
Bibliographie	82
Annexes	89
A Procédures expérimentales	93
B Spectres RMN ¹H	97
C Spectres RMN 2D	107

Liste des figures

1	Organigramme de l'équipe Métabolites de Végétaux : Isolement, Synthèse et Bioactivité	xiv
2	Les grands groupes de plantes	8
3	Schéma de l'inflorescence d' <i>Euphorbia</i> . ⁴	10
4	Schéma du cyathe d' <i>Euphorbia</i> . ⁴	11
5	Structure du paclitaxel (taxol).	14
6	Biosynthèse des précurseurs des terpènes chez les plantes. ¹⁴	16
7	Les deux types de cyclisation d'un tetraprenyl phosphate.	18
8	<i>Ricinus communis</i> . ²¹	19
9	Schéma biosynthétique des squelettes cembrane et casbane.	20
10	Schéma biosynthétique du squelette jokinol C à partir du casbène. ²⁵	21
11	Voie de biosynthèse possible des jatropholanes à partir des lathyranes.	22
12	Voie de biosynthèse possible des crotofolanes à partir des jatropholanes.	22
13	Hypothèses biosynthétiques du squelette jatrophane.	23
14	Hypothèse biosynthétique du squelette <i>abeojatrophane</i> à partir du squelette jatrophane.	23
15	Voie de biosynthèse possible des paralianes, des pépluanes et des ségétanes à partir des jatrophanes. ^{35,36}	24
16	Exemples de phorboïdes	25
17	Relations topologiques entre les phorboïdes et les autres DM.	26

18	Hydroxylation du C-13 d'un tigliane, hydroxylation opposée à la jonction des cycles A et B entre un tigliane et un lathyrane, double liaison 12-13 empêchant la cyclisation entre les position 8 et 14 d'un lathyrane.	27
19	Analyse rétrobiosynthétique du squelette tigliane ¹⁷	28
20	Transposition allylique menant du GGPP au GLPP	29
21	Voies de biosynthèse possibles des lathyranes et des tiglianes	29
22	Voie de biosynthèse possible des ingénanes	30
23	Voie de biosynthèse possible des rhamnifolanes	31
24	Voie de biosynthèse possible des daphnanes à partir des tiglianes	31
25	<i>Euphorbia lagascae</i> ⁴⁹	34
26	Exemple de molécules inhibitrices de la MDR	36
27	Exemple de DM modulateurs des PKCs	38
28	<i>Homalanthus nutans</i> ⁶⁷	39
29	<i>Croton tiglium</i> L. ⁷⁰	40
30	Mécanisme d'action de l'ingénol mébutate. ⁵⁵	40
31	Inflorescence de <i>S. guyanensis</i>	46
32	Fleur femelle sans pétale de <i>S. guyanensis</i>	46
33	Schéma de fractionnement de l'extrait d'écorces de <i>S.guyanensis</i>	48
34	Structures des composés 1 à 3. Corrélations COSY (gras), HMBC (noir) et NOESY (rouge) clés des composés 1 et 2.	50
35	Vue ORTEP du composé 3 .	50
36	Structures des composés 4 à 7. Corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés des composés 4 et 7. Corrélations NOESY (rouge) clés du composé 7	53
37	Vue ORTEP du composé 4 obtenue par cristallographie	53
38	Structures des composés 8 à 11. Corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés des composés 8 et 9 .	56

39	Effets NOE clés du composé 8	56
40	Structures des composés 12 à 15 et des jatrointelones A et C. Corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé 15	61
41	Vue ORTEP du composé 12 obtenue par cristallographie et effets NOE clés du composé 15	62
42	Structures et corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé 16	62
43	Effets NOE clés du composé 16	62
44	Structures et corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé 17	63
45	Effets NOE clés du composé 17	63
46	(A) Réseau moléculaire des fractions (F3-F16) de l'écorce de <i>S. guyanensis</i> . (B) Clusters d'analogues du phorbol. La représentation de la quantification relative de chaque ion dans les fractions est basée sur l'aire des pics de LC-MS. (C) Spectres MS ² annotés comme analogues du TPA lors de la comparaison aux bases de données du GNPS. (D,E et F) Spectres MS ² des nodes D,E et F provenant du cluster (B) montrant des fragments caractéristiques des phorbols et des pertes de neutres correspondant à différents acides gras.	67
47	Hypothèses biosynthétiques des diterpènes dégradés isolés de <i>S. guyanensis</i>	70
48	Hypothèse biosynthétique des euphoractanes isolés de <i>S. guyanensis</i> .	71
49	Carte politique de la pangée ⁹⁰	77
50	Spectre ¹ H du composé 1 (500 MHz, CDCl ₃)	98
51	Spectre ¹ H du composé 2 (500 MHz, CDCl ₃)	98
52	Spectre ¹ H du composé 3 (500 MHz, CDCl ₃)	99
53	Spectre ¹ H du composé 4 (500 MHz, MeOD)	99

54	Spectre ^1H du composé 5 (500 MHz, CDCl_3)	100
55	Spectre ^1H du composé 6 (500 MHz, CDCl_3)	100
56	Spectre ^1H du composé 7 (500 MHz, CDCl_3)	101
57	Spectre ^1H du composé 8 (500 MHz, CDCl_3)	101
58	Spectre ^1H du composé 9 (500 MHz, CDCl_3)	102
59	Spectre ^1H du composé 10 (500 MHz, CDCl_3)	102
60	Spectre ^1H du composé 11 (500 MHz, CDCl_3)	103
61	Spectre ^1H du composé 12 (500 MHz, CDCl_3)	103
62	Spectre ^1H du composé 13 (500 MHz, CDCl_3)	104
63	Spectre ^1H du composé 14 (500 MHz, CDCl_3)	104
64	Spectre ^1H du composé 15 (500 MHz, CDCl_3)	105
65	Spectre ^1H du composé 16 (500 MHz, CDCl_3)	105
66	Spectre ^1H du composé 17 (500 MHz, CDCl_3)	106
67	Spectre HMBC du composé 3 (500 MHz, CDCl_3)	108
68	Spectre COSY du composé 4 (300 MHz, MeOD)	108
69	Spectre COSY du composé 6 (300 MHz, CDCl_3)	109
70	Spectre NOESY du composé 7 (500 MHz, CDCl_3)	109
71	Spectre HMBC du composé 8 (300 MHz, CDCl_3)	110
72	Spectre COSY du composé 8 (300 MHz, CDCl_3)	110
73	Spectre NOESY du composé 8 (500 MHz, CDCl_3)	111
74	Spectre NOESY du composé 9 (500 MHz, CDCl_3)	111
75	Spectre COSY du composé 10 (500 MHz, CDCl_3)	112
76	Spectre HMBC du composé 11 (500 MHz, CDCl_3)	112
77	Spectre COSY du composé 12 (500 MHz, CDCl_3)	113
78	Spectre HMBC du composé 13 (300 MHz, CDCl_3)	113
79	HMBC C-12/H-20/C-13 du composé 14 (300 MHz, CDCl_3)	114
80	Spectre HMBC du composé 17 (500 MHz, CDCl_3)	114

- 81 Spectre NOESY entre H-4 et H-15 du composé **15**. Mesure de la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-4/H-15}}$ sur le spectre COSY (insert haut) et sur le spectre ${}^1\text{H}$ (insert bas) (500 MHz, CDCl_3) 115

Liste des tableaux

I	Lignée taxonomique des Euphorbiaceae	8
II	Données RMN ^1H des composés 1 , 2 et 3 (500 MHz, CDCl_3).	51
III	Données RMN ^1H des composés 4 à 7 (500 MHz, MeOD (4), CDCl_3 (5 à 7).	54
IV	Données RMN ^1H des composés 8 à 11 (500MHz CDCl_3)	57
V	Données RMN ^1H des composés 12 à 17 (500MHz CDCl_3)	60
VI	Données RMN ^1H des composés 12 à 17 (500MHz CDCl_3)	64
VII	Données RMN ^{13}C des composés 1 à 17 (125 MHz, MeOD (4), CDCl_3)	65

Abréviations

ACN acétonitrile

AcOEt acétate d'éthyl

ADN acide déoxyribonucléique

CBS casbène synthase

CHIKV virus du chikungunya

COSY correlation spectroscopy

CYP450 cytochrome P450 monooxygénase

DAG diacylglycérol

DM diterpènes macrocycliques

DMAPP diméthylallyl diphosphate

DXP 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate

GGPP géranylgéranyl diphosphate

GLPP géranyllinalyl diphosphate

HMBC heteronuclear multi-bond connectivity

HMG-CoA 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA

HRESIMS(+) high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry

HSQC heteronuclear single quantum coherence

IPP isopentenyl diphosphate

MDR Multi-Drug-Resistance

MEP 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

MVA mévalonate

NOESY nuclear overhauser effect spectroscopy

Pgp glycoprotéine P

PKCs protéines kinases C

RMN résonance magnétique nucléaire

TPA tétradécanoylphorbol-13-acétate

VIH virus de l'immunodéficience humaine

NB : certains termes ont été empruntés à la langue anglaise pour faciliter la compréhension

Introduction

En chimie organique, la définition d'un **produit naturel** correspond habituellement à un composé organique isolé d'une source naturelle qui est produit par le métabolisme primaire ou le métabolisme spécialisé initialement connu sous le nom de métabolisme secondaire. En chimie thérapeutique, la définition est souvent restreinte aux **métabolites spécialisés**. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites spécialisés ne sont pas essentiels à la survie, mais ils fournissent néanmoins des **avantages évolutifs** au sein des êtres vivants tels que les plantes. La plupart de ces composés ont un but particulier ; ils protègent la plante sessile qui ne peut pas fuir un prédateur par des propriétés amères, piquantes ou toxiques et sont donc vouées à interagir avec d'autres êtres vivants.

Le papyrus Ebers est l'un de plus vieux documents décrivant l'usage des substances naturelles pour soulager les maux. Un grand nombre de plantes sont décrites dans ce manuscrit regroupant plus de 700 remèdes et formules magiques parmi lesquels des préparations à base de Ricin (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). Au premier siècle après J-C, Dioscoride détaille plus de 600 plantes médicinales dans son livre "De Materia Medica". Cette collection de remèdes résulte de l'expérience acquise au fil des siècles et bon nombre d'informations ne peuvent être interprétées qu'au regard des connaissances de cette époque. Cependant, de nombreuses plantes ont longtemps été utilisées en médecine traditionnelle, à l'image de la digitale pourpre, l'opium ou l'écorce de quinquina qui ont été remplacées dès le début du XIX^{ième} siècle par leur principes actifs isolés, la digitoxine, la morphine, la quinine...

Dans les années 1990, les compagnies pharmaceutiques ont progressivement abandonné les substances naturelles, au profit de la chimie combinatoire et du criblage haut débit utilisant de vastes bibliothèques de petites molécules synthétiques. Les bibliothèques de produits naturels, quant à elles, étaient souvent constituées d'une association d'extraits, de fractions partiellement purifiées et de composés purs, les rendant *a priori* incompatibles avec les plateformes de criblage haut débit. Quelques années plus tard une **étroite corrélation entre le désintérêt des produits naturels et la chute du nombre de nouveaux candidats médicaments** a été constatée.¹

En 2015, le Prix Nobel en Physiologie ou Médecine a été attribué à William C. Campbell, Satoshi Omura, et Youyou Tu pour la découverte des avermectines et de l'artémisinine, des composés qui ont révolutionné le traitement de certaines maladies tropicales dévastatrices. Les deux programmes de recherche ont débuté par le criblage de bibliothèques de produits naturels et amènent donc à reconsidérer l'apparente incompatibilité des substances naturelles avec les plateformes de recherche haut débit.

La formidable diversité chimique des produits naturels dépasse de loin la créativité des chimistes. Leur point fort réside notamment dans une **structure tridimensionnelle** qui s'oppose à la planéité de nombreux composés synthétiques. Toutefois, c'est également un inconvénient. En plus de leur faible accessibilité ; du fait de leur complexité, la pharmacomodulation est souvent difficile et coûteuse si bien que les compagnies pharmaceutiques hésitent à investir dans leur optimisation. Néanmoins, lorsqu'on considère les interactions cible-ligand, les produits naturels, qu'ils soient issus de plantes, d'organismes marins ou de micro-organismes, sont d'excellents candidats. En effet, durant leur biosynthèse, tous les métabolites spécialisés ont déjà "vu" le site de reconnaissance d'une protéine ; ainsi, leurs caractéristiques structurales et leurs propriétés orientent l'interaction avec les protéines et par extension l'activité biologique. Sélectionnées par des milliards d'années d'évolution, ces méta-

bolites originaux, aux structures complexes possèdent des propriétés pour la santé et le bien-être de l'Homme. Elles ont, à de nombreuses reprises, inspiré l'industrie pharmaceutique et sont sans nul doute la **meilleure source de molécules thérapeutiques**.

Les récents progrès en génomique et en biotechnologie, ont considérablement élargi l'espace chimique des substances naturelles et permettent aujourd'hui la production de produits naturels complexes et issus d'espèces rares grâce à des modèles d'hôtes hétérologues. La **compréhension de voies de biosynthèse** des produits naturels, permet des manipulations rationnelles de la machinerie biosynthétique de la Nature, pour la production de substances naturelles ou d'analogues.

Ce manuscrit a pour but de mettre en avant l'intérêt pharmaceutique d'une catégorie de métabolites spécialisés produits quasi-exclusivement par les plantes de la famille des Euphorbiaceae. Un état de l'art concernant l'origine biosynthétique des principales classes de diterpènes macrocycliques (DM) et les mystères de leurs relations topologiques sera présenté, puis l'étude phytochimique d'une Euphorbiaceae tropicale (*Sandwithia guyanensis*) permettra d'apprécier l'étonnante diversité structurale en DM que cette espèce est capable de produire.

Première partie

Partie bibliographique

Chapitre 1

La famille botanique des Euphorbiaceae

1.1 Classification et distribution

Il existe plusieurs grands groupes de plantes, dont les angiospermes ou plantes à fleurs, qui sont les plus largement représentées (Figure 2). Elles sont apparues il y a environ 140 millions d'années et occupent aujourd'hui la quasi totalité des terres émergées (ou des écosystèmes terrestres). Elles font partie des plantes vasculaires caractérisées par un système de cellules spécialisées formant le tissu vasculaire. Ces cellules fournissent le support permettant aux plantes vasculaires de se développer en hauteur et un système de transport de l'eau, des minéraux et des produits de la photosynthèse à l'intérieur de la plante. Les Euphorbiaceae sont une famille de plantes appartenant à l'ordre des Malpighiales au sein des Angiospermes Eudicotylédones. Elle est divisée en 4 sous-familles : les cheilosoideae, les acalyphoideae, les crotonoideae et les euphorbioideae. Plus de 6500 espèces d'Euphorbiaceae réparties dans environ 220 genres sont répertoriées à l'heure actuelle. Les genres les plus représentés sont *Euphorbia* et *Croton*.²

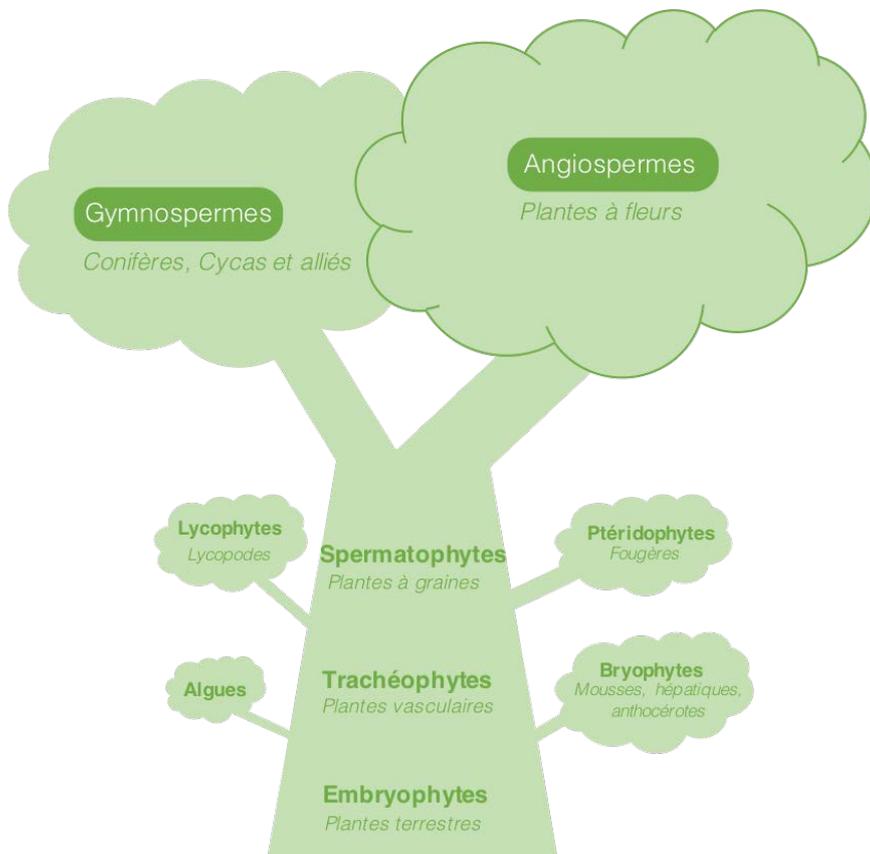


FIGURE 2 – Les grands groupes de plantes

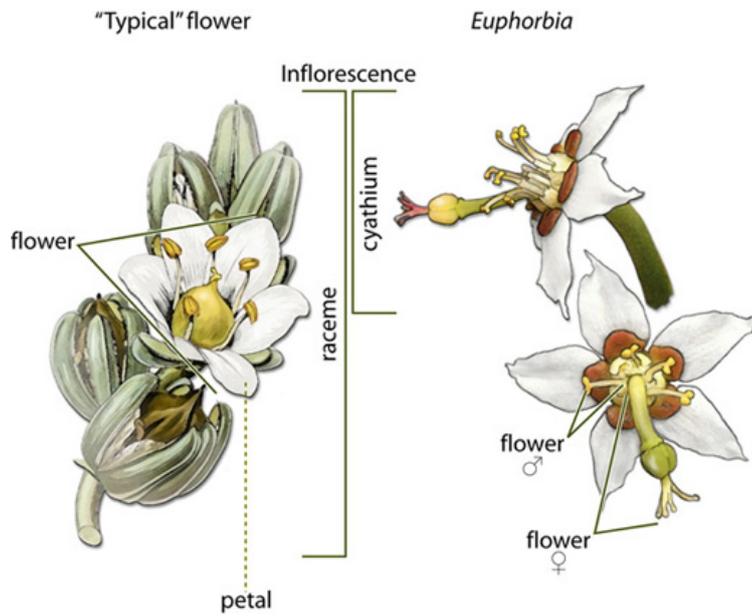
Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotylédones supérieures
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Malpighiales
Famille	Euphorbiaceae
Sous-familles	Cheilosoideae Acalyphoideae Crotonoideae Euphorbioideae

Tableau I – Lignée taxonomique des Euphorbiaceae

Les Euphorbiaceae sont retrouvées dans la plupart des continents du monde à l'exception de l'Arctique et de l'Antarctique. Elles sont mieux représentées dans les régions tropicales où elles possèdent une grande diversité par zone d'habitat. Plusieurs espèces présentent une très grande importance économique : *Hevea brasiliensis* (dont le latex donne le caoutchouc), *Manihot esculenta* (dont les tubercules donnent le manioc), *Ricinus communis* (ricin)... En culture ornementale d'intérieur, on trouve également les Crotons aux feuilles panachées et l'*Euphorbia pulcherrima* également appelée Poinsettia ou Étoile de Noël.

1.2 L'appareil reproducteur

Avant d'aller plus loin, il est important de considérer les étonnantes caractéristiques de cette famille, en commençant par l'inhabituelle structure florale. En fait, ces plantes n'ont pas de fleur au sens commun du terme, mais elles ont développé une structure florale hautement spécialisée, appelée un cyathe (du grec kyathos = coupe) (Figure 4). Il consiste en un réceptacle en forme de petite coupe contenant les fleurs. Le cyathe peut être unisexué ou bisexué. Lorsqu'il est unisexué, il est composé soit d'une seule fleur femelle, soit de plusieurs fleurs mâles. Le cyathe bisexué quant à lui, contient une fleur femelle entourée de nombreuses fleurs mâles. Autour de ce système, cinq lobes alternent avec cinq nectaires ou glandes. La forme de ces glandes varie en fonction des espèces et c'est leur teinte qui donne sa couleur au cyathe. Des bractées pouvant être colorées entourent le cyathe et participent à l'aspect attractif de l'inflorescence des Euphorbiaceae. Le cyathe bisexuel est le plus commun, tandis que le cyathe unisexué est considéré comme le plus évolué du fait de vestiges de fleurs femelles retrouvés dans les cyathes mâles.³ Le fruit est généralement une capsule à trois loges contenant chacune une seule graine. Les graines sont albuminées (huileuse ou renfermant des huiles) et pourvues d'une caroncule, petite expansion charnue appréciée des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des

FIGURE 3 – Schéma de l'inflorescence d'*Euphorbia*.⁴

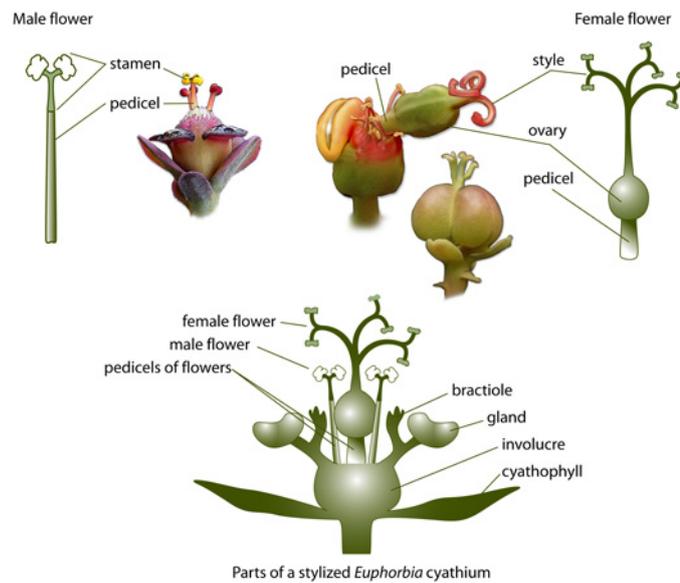
graines.

1.3 L'appareil végétatif

L'appareil végétatif des Euphorbiaceae est très varié. Ce sont des arbres ou des arbustes, des herbes, des lianes, des plantes cactiformes voire des herbes aquatiques flottantes. Leurs tiges sont parfois succulentes et leurs racines parfois tubéreuses. Les feuilles sont également très variables mais elles sont souvent longuement pétiolées et alternes.

1.4 Les laticifères

Une autre caractéristique importante des Euphorbiaceae est la capacité d'un grand nombre d'espèces à produire du latex. Le latex n'est pas une sève mais une émulsion laiteuse produite par des cellules spécialisées appelées laticifères. Ces structures sont différentes du tissu sécrétoire dans lequel la résine est généralement pro-

FIGURE 4 – Schéma du cyathe d'*Euphorbia*.⁴

duite. Deux types de laticifères sont reconnus :

- La forme articulée s'organise en vaisseaux constitués de nombreuses cellules jointives. Ces vaisseaux peuvent s'anastomoser pour former des réseaux complexes.
- La forme non-articulée constituée d'une cellule individuelle multinucléée pouvant s'étendre des racines jusqu'au sommet de la tige.^{5,6}

La composition du latex est un mélange complexe de terpènes, de composés phénoliques, de protéines, de sucres, etc. À l'heure actuelle, le rôle biologique du latex ne fait pas consensus bien que bon nombre d'auteurs s'accordent sur des fonctions défensives. Le latex permettrait en effet de repousser les animaux et les insectes brouteurs, de tuer ou contrôler la croissance des phytopathogènes et de réparer les blessures de la plante.⁷

Chapitre 2

Origine des diterpènes macrocycliques

Les terpènes sont des hydrocarbures aux structures très variées qui constituent la plus grande famille de produits naturels avec plus de 35 000 composés connus. Ils dérivent d'unités isoprènes assemblées de manière tête-à-queue donnant des squelettes carbonés typiques en $(C_5)_n$. Les terpènes sont classés selon le nombre d'unité isoprène en hemiterpène (C_5), monoterpène (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}), et tétraterpènes (C_{40}). Les plus légers sont les composants principaux des huiles essentielles, tandis que les polymères les plus lourds sont retrouvés dans les latex, les gommes et les résines. Leur nom fait référence à la té-rébenthine, une oléorésine isolée d'un pin connue pour ses propriétés antiseptiques et décongestionnante. L'isoprène est considéré comme l'unité de base des terpènes car il s'agit de leur produit de décomposition. Cependant, il n'est pas directement impliqué dans la formation de ces composés. Les précurseurs biochimiquement actifs sont en fait des esters de diphosphate (pyrophosphate), le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) et l'isopentenyl diphosphate (IPP) qui se condensent par addition électrophile. La majorité des terpènes subissent ensuite des réactions de cyclisation ; ce qui explique la rareté des terpènes linéaires (*e.g.* géraniol, squalène). Dans de nombreux

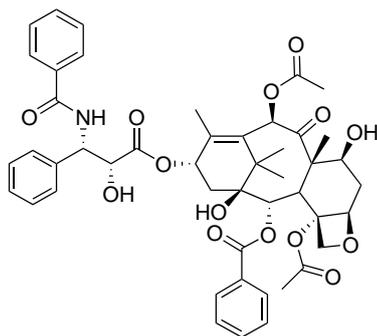


FIGURE 5 – Structure du paclitaxel (taxol).

cas des réarrangements et des fonctionnalisations ont lieu à tel point qu'il est parfois difficile de reconnaître l'arrangement linéaire des unités isopréniques (Figure 5).⁸ Les diterpènes sont des composés issus de l'assemblage de quatre unités isopréniques et la grande majorité sont cycliques. Ils sont classés en deux catégories en fonction du type de cyclisation : les diterpènes polycycliques et les diterpènes macrocycliques (DM). La distribution des DM est limitée aux Euphorbiaceae et aux Thymelaeaceae tandis que les diterpènes polycycliques sont retrouvés dans de nombreuses autres familles de plantes.⁹ Le premier DM d'Euphorbiaceae, l'euphorbiasteroïde a été isolé en 1937 de l'huile de graine d'*Euphorbia lathyris*. Sa structure possédant un squelette lathyrane a été élucidée en 1970.¹⁰ Actuellement, les diterpènes isolés de plantes comptent plus de 10 000 structures.¹¹

2.1 Les métabolites précurseurs

Dans les plantes, l'IPP et le DMAPP peuvent être synthétisés selon deux voies compartimentées (Figure 6) :

La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) commence dans les **plastides** par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate pour donner le 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP). Le DXP est ensuite réduit en MEP, lui-même converti en IPP et en DMAPP.

La voie du mévalonate (MVA) a lieu dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et les péroxisomes. La condensation de trois molécules d'acétyl-CoA donne d'abord le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA réductase réalise ensuite la transformation irréversible de l'HMG-CoA en MVA menant à la formation de l'acide mévalonique qui est ensuite converti en IPP. Contrairement à la voie MEP, la voie MVA ne produit que l'IPP. Or le cation allylique issue du DMAPP est essentiel aux réactions d'élongation de la chaîne isoprényle. L'IPP produit par la voie du MVA doit donc être converti en DMAPP par l'intermédiaire des IPP isomérases de type 1 et 2.¹²

Les hommes, les animaux, les champignons, les archeae et quelques bactéries Gram+ dépendent exclusivement de la voie du MVA tandis que la plupart des bactéries utilisent uniquement la voie MEP pour la synthèses des terpènes. Les IPP isomérases sont donc indispensables aux organismes ne possédant que la voie MVA. Les plantes, quant à elles, peuvent emprunter l'une ou l'autre de ces voies. Cette particularité est due à l'acquisition de la voie MEP par l'endosymbiose d'une cyanobactérie au cours de l'évolution, ce qui expliquerait le confinement de la voie MEP dans les plastes au sein des plantes.^{13,14}

Les plastes sont des organites semi-autonomes possédant un ADN propre. Ils sont retrouvés dans pratiquement toutes les plantes et algues. Les plastes jouent des rôles clés dans la photosynthèse (chloroplastes), la synthèse des lipides et des acides-aminés (protéinoplaste), le stockage de l'amidon et des huiles (amyloplaste et élaïoplaste respectivement), la couleur des fruits et des fleurs, voir la perception de l'environnement. Ils sont retrouvés dans toutes les parties de la plante, notamment les laticifères d'où la présence de nombreux DM dans le latex d'Euphorbiaceae.^{15,16}

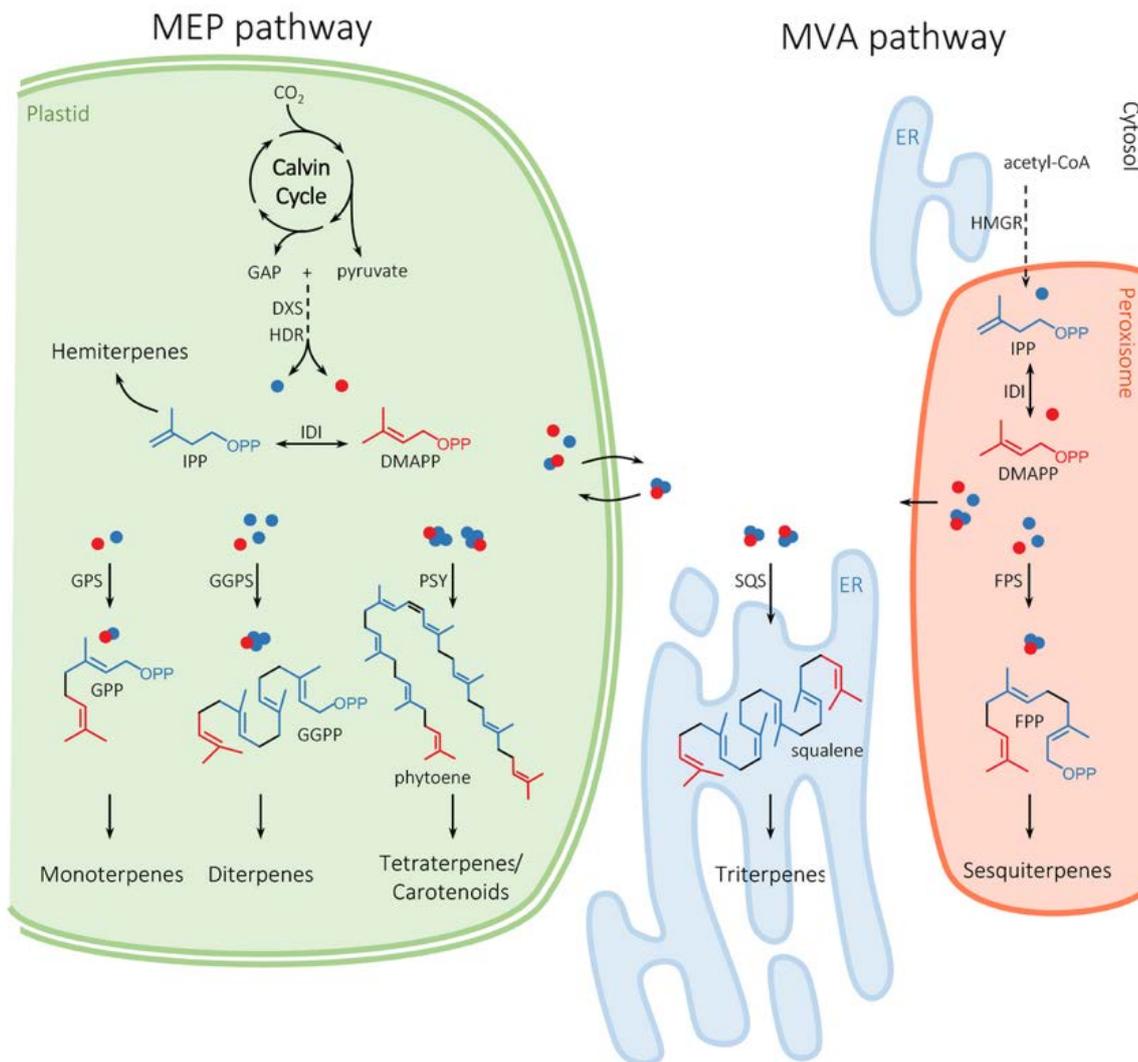


FIGURE 6 – Biosynthèse des précurseurs des terpènes chez les plantes.¹⁴

2.2 Les voies de biosynthèse

La cyclisation du précurseur tetraprényl, le géranylgeranyl diphosphate (GGPP) médiée par la formation d'un carbocation, puis de potentiels réarrangements de Wagner-Meerwein, permet la production d'une grande diversité de squelettes carbonés notamment au sein des Euphorbiaceae. Les diterpènes peuvent être classés selon le type de cyclisation de leur précurseur (Figure 7) :

- Les diterpènes polycycliques dérivent de la cyclisation en cascade du GGPP sous l'action de cyclases de type 2. Ils sont représentés principalement par les abiétanes, les pimaranes, les kauranes, les atisanes et les trachylobanes.
- Les DM dérivent de la cyclisation de type tête-à-queue du GGPP sous l'action des cyclases de type 1. Le mécanisme implique la formation d'un cation et différentes étapes de cyclisation formant des composés monocycliques dérivés du cembreane, bicycliques dérivés du casbane (section 2.2.1) tricycliques dérivés du lathyrane (section 2.2.2).¹⁷

Comme l'illustrera le chapitre 3, les DM possèdent d'importants intérêts économiques et pharmaceutiques. Les progrès récents en génomique et biotechnologie fournissent des solutions efficaces pour la production des terpènes structurellement complexes. Cependant, la reproduction des voies biosynthétiques par bio-ingénierie implique leur connaissance approfondie. Seulement, malgré leurs intérêts chimiques et pharmacologiques, les voies biosynthétiques des DM restent très peu décrites. Ce chapitre présente les voies de biosynthèse des principaux squelettes de DM proposées dans la littérature.

2.2.1 Les cembranes et les casbanes

Le squelette cembreane consiste en un macrocycle de 14 carbones substitués par un groupement isopropyl en position 1 et trois méthyles en positions 4, 8 et 12. Les cembranes naturels sont fonctionnalisés par des sucres, des alcool, des lactones. Bien

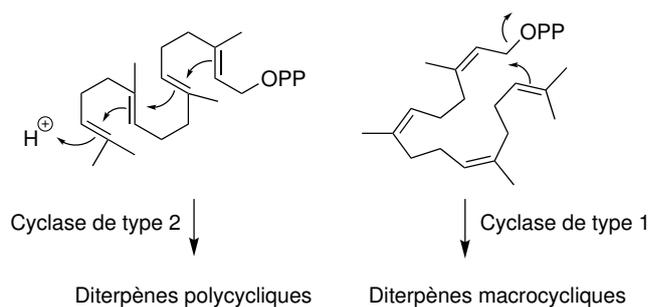


FIGURE 7 – Les deux types de cyclisation d'un tetraprenyl phosphate.

qu'il ait été isolé pour la première fois d'un pin en 1926, les premières études établissant formellement la structure du squelette cembrene ont été publiées en 1962.¹⁸ Le cation cembrene est considéré comme l'intermédiaire commun à la production de tous les squelettes de DM par différentes séquences enzymatiques.¹⁹ Le squelette casbane se distingue du cembrene, par le remplacement du groupement isopropyl par un cyclopropane, substitué par un groupement gem-diméthyl. Isolé pour la première fois en 1970, le casbène issu de la cyclisation du cembrene est un diterpène bicyclique servant de phytoalexin chez *Ricinus communis* (Figure 8).²⁰ Peu d'informations sont disponibles quant aux voies de biosynthèse menant aux dérivés du casbène. Cependant, il est admis que le groupement diphosphate du GGPP est d'abord clivé pour former un cation délocalisé, qui interagit ensuite avec la double liaison 14-15 pour conduire au cation cembrene macrocyclique. Enfin, la formation du cyclopropane par perte d'un proton donne le casbène (Figure 9).

La casbène synthase

La séquence décrite ci-dessus est catalysée par une seule enzyme appelée casbène synthase (CBS). La casbène synthase a été purifiée de *Ricinus communis* en 1978 et peut être identifiée comme l'enzyme catalysant la biosynthèse du casbène à partir du GGPP.²² Un cation divalent est probablement crucial pour le clivage enzymatique du diphosphate allylique au début du cycle catalytique mais le mécanisme n'a pas encore été élucidé. Pendant longtemps ce fut le seul rapport de la caractérisation



FIGURE 8 – *Ricinus communis*.²¹

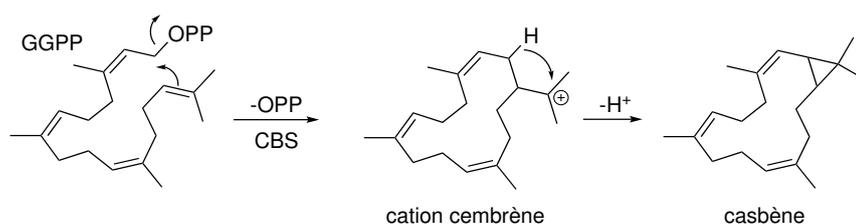


FIGURE 9 – Schéma biosynthétique des squelettes cembrane et casbane.

d'une enzyme catalysant les réactions de cyclisation menant aux squelettes carbonés des DM. C'est seulement récemment que les équipes de Demura puis Keasling ont réussi à isoler et cloner des homologues de la casbane synthase chez un *Jatropha* sp. et des *Euphorbia* spp., respectivement. N'ayant pas réussi à isoler d'autres diterpènes synthases, chez les espèces produisant des squelettes plus complexes que le casbane (*i.e.* phorboïdes et lathyranes), les auteurs confirment le rôle critique de la CBS dans la biosynthèse des DM et suggèrent l'implication des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450) dans la production des DM fonctionnalisés. Par ailleurs, ils caractérisent la néocembrène synthase chez *R.communis* qui catalyse la formation du néocembrène via le cation cembrène. Il s'agit de la première description du gène de la néocembrène synthase mais son rôle dans la biosynthèse des diterpènes d'Euphorbiaceae reste à clarifier.^{23,24}

2.2.2 Les lathyranes et leurs dérivés

Les lathyranes

Les lathyranes sont caractérisés par une structure de type 5/11/3, un cyclopentane fusionné à un macrocycle à 11 carbones portant lui-même un cyclopropane. Le squelette lathyrane isolé pour la première fois d'*E. lathyris* suscite l'intérêt du fait de la capacité de cette famille de molécules à inhiber les transporteurs ABC, les protéines d'efflux responsables de la perte d'efficacité des traitements des cancers multirésistants (section 3.1).²⁵ Le casbane a été proposé comme le premier intermé-

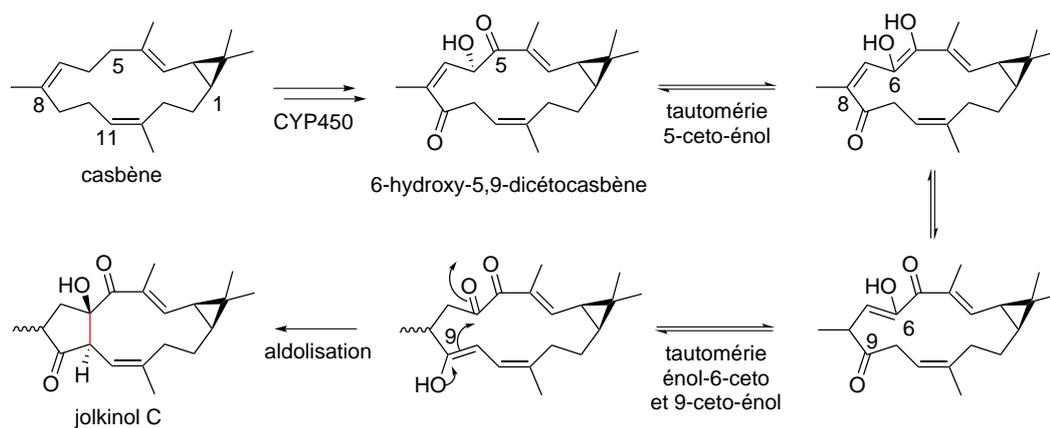


FIGURE 10 – Schéma biosynthétique du squelette jokinol C à partir du casbène.²⁵

diaire des DM plus complexes retrouvés au sein des Euphorbiaceae dont le squelette lathyrane. Cependant, les mécanismes de cyclisation intramoléculaires et les réarrangements menant aux lathyranes restent hypothétiques. Les lathyranes possèdent des degrés d'oxydation supérieurs à ceux des casbènes de sorte que les cyclisations intramoléculaires semblent avoir lieu selon des voies communes contrôlées par les CYP450.²⁶ Cette relation entre cyclisation et degré d'oxydation peut fournir des informations clés dans la formation des DM. C'est ainsi que l'équipe de King a démontré que les CYP450 ne sont pas uniquement responsables de la décoration des squelettes de DM mais qu'ils initient des cyclisations intramoléculaires.²⁵

La conversion du casbène en lathyrane implique la création d'une liaison entre les positions 6 et 10 (numérotation des casbanes, 4 et 15 : numérotation des lathyranes). Cette cyclisation requiert, l'activité de deux CYP450 pour former un intermédiaire 6-hydroxy-5,9-dicétocarbène dont un des tautomères (9-hydroxy-5,6-dicétocarbène) peut subir une aldolisation (Figure 10).

Les Jatrophanes et les (iso)crotofolanes

Les jatrophanes sont des diterpènes rares caractérisés par un système tétracyclique 5/6/7/3 isolés pour la première fois de *Jatropha gossypifolia* puis de *Jatropha elliptica* et *Jatropha curcas*. Selon Duarte et al., ils pourraient dériver des lathyranes

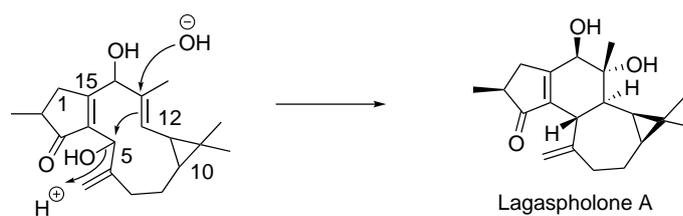


FIGURE 11 – Voie de biosynthèse possible des jatropholanes à partir des lathyranes.

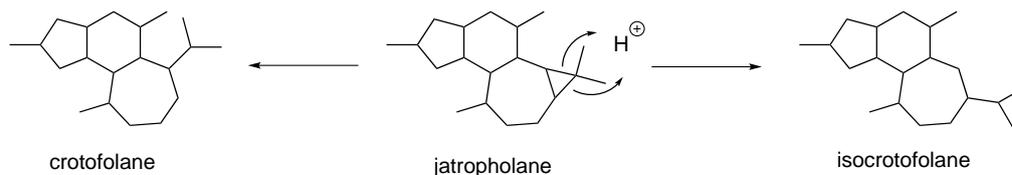


FIGURE 12 – Voie de biosynthèse possible des crotofolanes à partir des jatropholanes.

dont l'oxydation de la position 13 permettrait la fermeture transannulaire du macrocycle entre les positions C-5 et C-12 (Figure 11).²⁷

Le squelette crotofolane a été isolé et caractérisé pour la première fois en 1975 (chan et al) à partir de *Croton corylifolius*.²⁸ Le mécanisme de biosynthèse proposé, consiste en l'ouverture du cyclopropane du squelette jatropholane, pour conduire au squelette crotofolane et le squelette isocrotofolane selon la nature du clivage de la liaison 10-11 ou de la liaison 9-10, respectivement (Figure 12).²⁹

2.2.3 Les jatrophanes et leurs dérivés

Les jatrophanes et les abeojatrophanes

Les jatrophanes sont caractérisés par une structure de type 5/12 : un cyclopentane hautement fonctionalisé et fusionné à un macrocycle à 12 carbones. Ils existent exclusivement chez les Euphorbiaceae en général sous forme de polyesters. La jatrophane, première molécule de type jatrophane, a été isolé de *Jatropha gossypifolia*.³⁰ Les jatrophanes, ne possèdent pas le cyclopropane présent chez les lathyranes ou les casbanes. Les informations concernant la biosynthèse des jatrophanes sont rares. Néanmoins, trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation du sque-

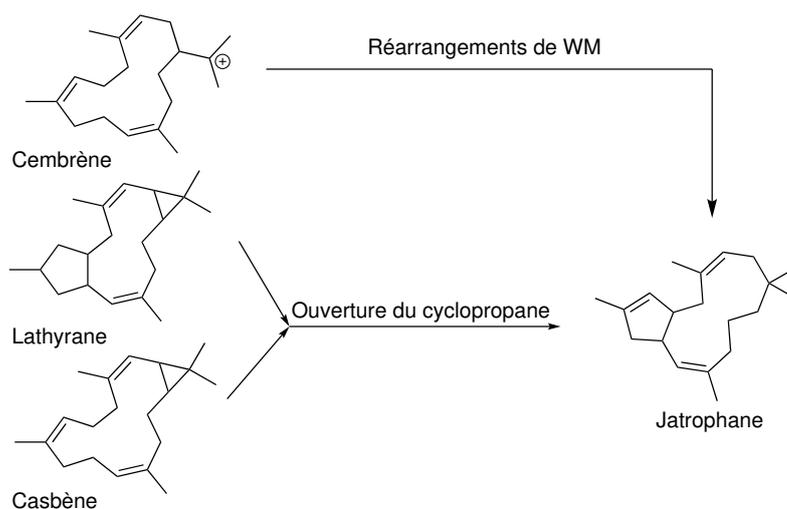
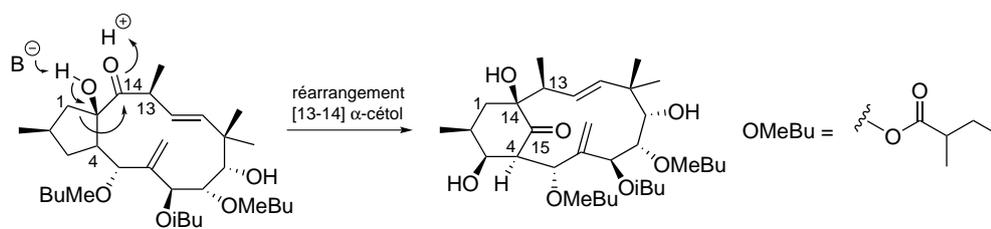


FIGURE 13 – Hypothèses biosynthétiques du squelette jatrophane.

FIGURE 14 – Hypothèse biosynthétique du squelette *abeo*jatrophane à partir du squelette jatrophane.

lette jatrophane :

- le macrocycle peut provenir du cembrène cationique par une séquence de réarrangements de Wagner-Meerwein.
- il pourrait également provenir du casbène si la formation du cyclopentane intervient après l'ouverture du cyclopropane.
- il pourrait être formé à partir du lathyrane si la formation du cyclopentane intervient avant l'ouverture du cyclopropane.³¹

Le squelette de type 1(15→14)*abeo*-jatrophane diffère du squelette jatrophane par la transformation de la liaison 1-15 en liaison 1-14. Cette extension de cycle peut être le résultat du réarrangement [13-14] α -cétol (pinacolique) d'un jatrophane oxydé en positions 14 et 15 (Figure 14).³²

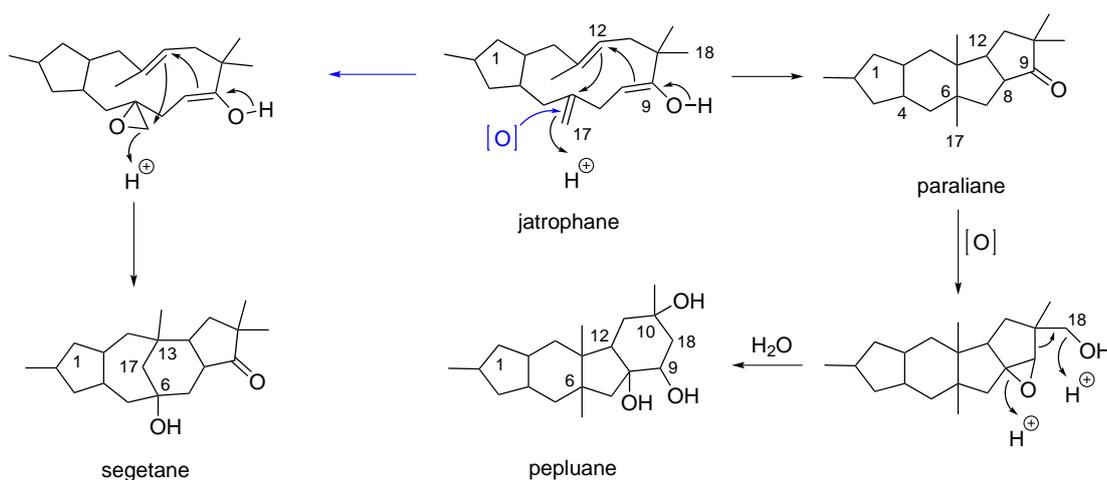


FIGURE 15 – Voie de biosynthèse possible des paralianes, des pépluanes et des ségétanes à partir des jatrophanes.^{35,36}

Les paralianes, les pépluanes et les ségétanes

Les paralianes isolés pour la première fois d'*Euphorbia paralias* en 1998 sont des systèmes tétracycliques 5/6/5/5 rares, probablement formés par une cyclisation transannulaire des jatrophanes.³³ Cette hypothèse est appuyée par le fait que des jatrophanes sont systématiquement co-isolés.³⁴ L'introduction d'un alcool primaire sur le gem-diméthyl suivi d'une expansion de cycle complète la formation du squelette pépluane (5/6/5/6). Le diol vicinal acétylé (C-8 et C-9) retrouvé chez tous les pépluanes connus, peut être expliqué par une époxydation enzymatique (Δ^{8-9}) suivie d'une ouverture de l'époxyde. Les ségétanes découverts en 1997 à partir d'*E. segetalis* peuvent de la même manière dériver d'un jatrophane époxydé en (Δ^{6-17}) 4 (Figure 15).^{35,36}

2.2.4 Les phorboïdes et leurs dérivés

Les phorboïdes sont une famille de diterpènes polycycliques structurellement reliés au squelette tigiane du phorbol et incluent les ingénanes comme l'ingénol-palmitate et les daphnanes comme la daphnétoxine (Figure 16). Le tigiane a été isolé pour la première fois en 1934. Le squelette ingénane quant à lui, a été découvert

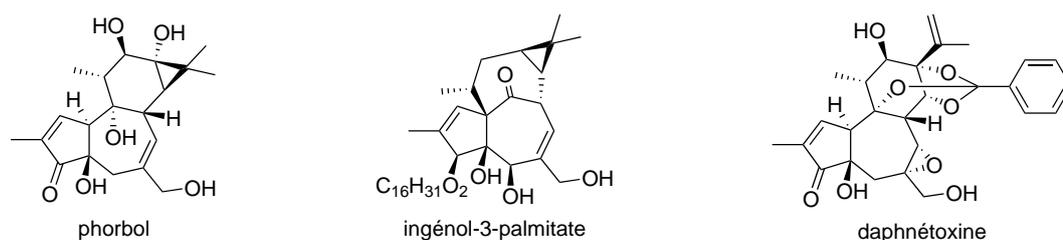


FIGURE 16 – Exemples de phorboïdes

bien plus tard en 1967 du fait d'une distribution limitée, d'une instabilité chimique et d'une faible concentration dans les plantes. Enfin le premier daphnane a été isolé et caractérisé en 1970.³⁷

D'un point de vue structural, les phorboïdes sont des diterpènes polycycliques, mais d'un point de vue biosynthétique, ils dérivent de précurseur macrocycliques. Même si il n'y a pas consensus, une vaste majorité des auteurs s'accordent sur le fait que les phorboïdes seraient le résultat de la cyclisation des lathyranes. Cependant, malgré des similarités entre le squelette lathyrane et le squelette tigliane, la relation entre les phorboïdes et les autres DM reste énigmatique. Les tiglianes peuvent théoriquement être convertis dans d'autres types de phorboïdes par des réarrangements cationiques typiques de la chimie des isoprènes et les incertitudes concernant ces mécanismes, résident dans la formation de la liaison 8-14 qui différencie les phorboïdes des lathyranes. Cette section explique la théorie de Jakupovic décrite par Appendino concernant l'origine des phorboïdes.¹⁷

Les lathyranes et les phorboïdes : une relation contestée

Malgré une connectivité carbone-carbone similaire entre les lathyranes et les tiglianes, plusieurs problèmes remettent en question une relation directe entre ces deux classes de composés (Figure 17) :

A. Alors que les tiglianes sont fréquemment retrouvés au sein des Euphorbiaceae, les lathyranes quant à eux sont beaucoup plus rares, restreints à quelques espèces du genre *Euphorbia*. Si les deux squelettes étaient biogénétiquement liés, on pourrait

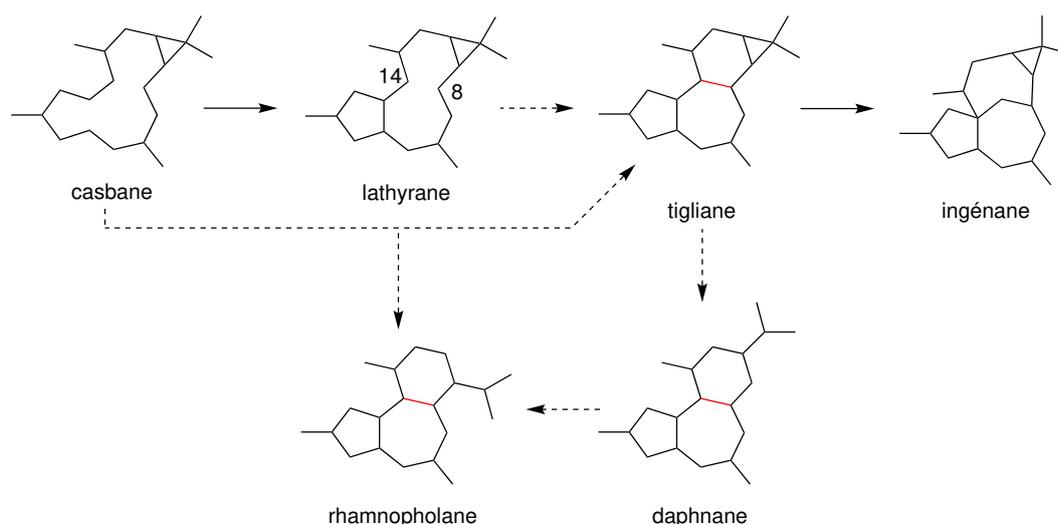


FIGURE 17 – Relations topologiques entre les les phorboïdes et les autres DM.

s'attendre à une présence simultanée beaucoup plus fréquente.

B. Comme dans le cas du phorbol ou du lathyrol, le carbone cyclopropylique C-13 (numérotation des tigliane, ou C-11 numérotation des lathyranes) est hydroxylé chez tous les tiglianes naturels ainsi que chez de nombreux ingénanes, alors qu'aucun lathyrane actuellement découvert n'est hydroxylé dans cette position.

C. Topologiquement, la conversion des lathyranes en tiglianes implique la formation d'une liaison entre les carbones C-8 et C-14 (C-8 et C-9 chez les tiglianes respectivement) mais aucun lathyrane isolé jusqu'à présent ne porte la fonctionnalisation pour cette cyclisation qui nécessite une complémentarité nucléophile électrophile entre ces deux carbones. En effet, le C-14 des lathyranes est généralement un carbonyle, alors que C-8 est plutôt hydroxylé ou porte un exométhylène non fonctionnalisé comme dans le cas du lathyrol.

D. La plupart des lathyranes contiennent au moins une double liaison endocyclique (E), ce qui d'une part, empêche l'interaction spatiale entre C-8 et C-14, et d'autre part, fait que la cyclisation en tigliane est impossible car les doubles liaisons (E) ne peuvent exister que dans les cycles à plus de 8 carbones. La cyclisation cationique des lathyranes permet le réarrangement en une grande variété de squelettes

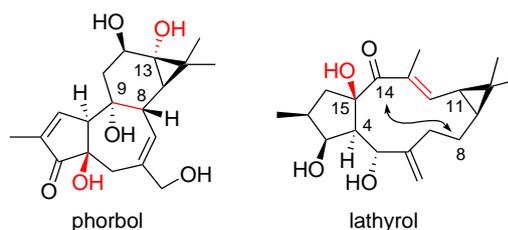


FIGURE 18 – Hydroxylation du C-13 d'un tigliane, hydroxylation opposée à la jonction des cycles A et B entre un tigliane et un lathyrane, double liaison 12-13 empêchant la cyclisation entre les position 8 et 14 d'un lathyrane.

de diterpènes, dont aucun ne ressemble au squelette tigliane.³⁸

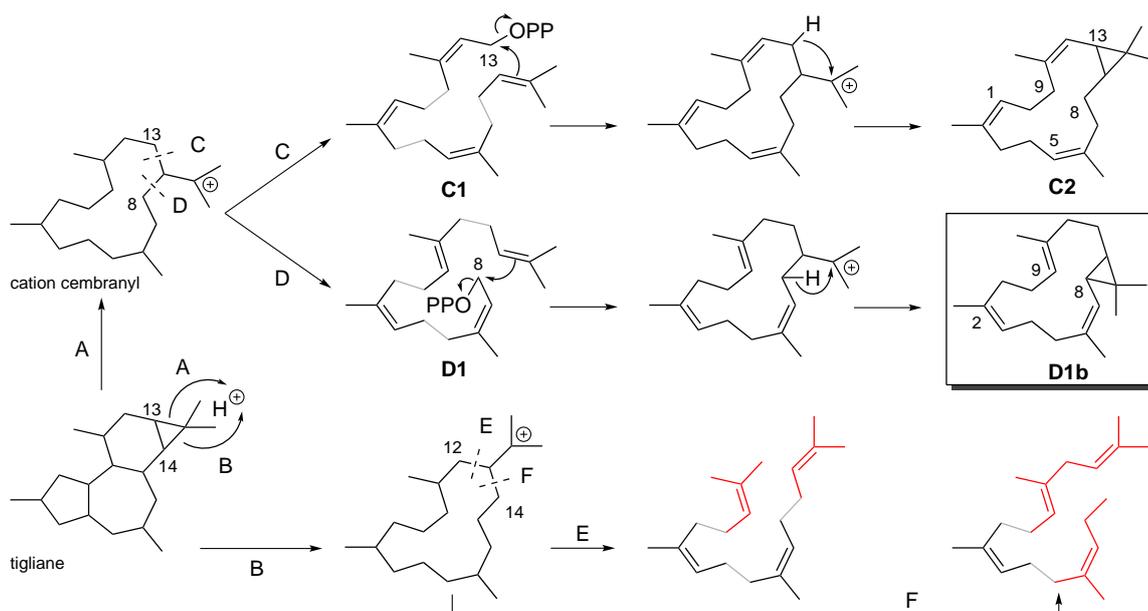
E. Les lathyranes et les tiglianes naturels sont hydroxylés de manière opposée au niveau de la jonction des cycles A et B comme le montre le phorbol et le lathyrrol.

Ces considérations remettent en cause l'hypothèse selon laquelle les tiglianes proviendraient des lathyranes.

La proposition de Jakupovic

Afin d'expliquer l'origine du squelette tigliane, Jakupovic a proposé une analyse rétrosynthétique suivant la règle de l'isoprène selon laquelle les unités isopréniques s'assemblent de manière tête-à-queue (Figure 19).³⁹ Ainsi, l'ouverture du cyclopropane par protonation du C-13 (voie A) connecte sans ambiguïté le squelette tigliane au cation cembranyl. L'ouverture alternative du cyclopropane par protonation en C-14 est en revanche incompatible avec la règle de l'isoprénoïde (voies B, E et F, Figure 19).¹⁷

Le cation cembranyl peut être généré à partir du précurseur tetraprényl acyclique par selon deux repliements distincts. La voie C (Figure 19) semble être la plus probable, car elle place correctement le cyclopropane sur le cycle C du squelette tigliane (C2). Au contraire, la voie D impliquant l'insertion du cation en C-8 paraît contre-intuitive car elle produirait un composé avec une mauvaise localisation du cyclopropane et un réarrangement serait nécessaire pour obtenir son emplacement naturel en C-13 (D1b). Cependant, ce réarrangement est au coeur de la proposition

FIGURE 19 – Analyse rétrobiosynthétique du squelette tigliane¹⁷

de Jakupovic et donne une explication mécanistique à toutes les incompréhensions de la biogenèse des phorboïdes. La voie C requiert un précurseur tetraprényl all-(Z) (**C1**) qui va mener à un composé non fonctionnalisé (en position 8 et 9) incompatible avec la formation la jonction de cycle B,C.¹⁷

La double liaison 6-7 du précurseur GGPP (**D1**) est allylique au groupement phosphate qui peut donc subir une transposition allylique classique pour mener au géranylinalyl diphosphate (GLPP) (**D2**), Figure 20). Après hydroxylation de la position 4 (voir section 2.2.2), le GLPP (**D2**) pourrait finalement être le précurseur commun des tiglianes et des lathyranes (Figure 21).⁴⁰ L'attaque électrophile sur l'une ou l'autre des faces de la double liaison terminale génère :

- Un composé (**D3**) possédant une double liaison 6-7 de configuration (E) dont le cyclopropane est orienté en α et qui après formation du cyclopentane donne un squelette tricyclique insaturé en positions 5 et 12 possédant une configuration typique des lathyranes (**D4**).
- Un composé (**D5**) possédant une double liaison 6-7 de configuration (Z) dont le cyclopropane est orienté en β et qui, après formation du cyclopentane et

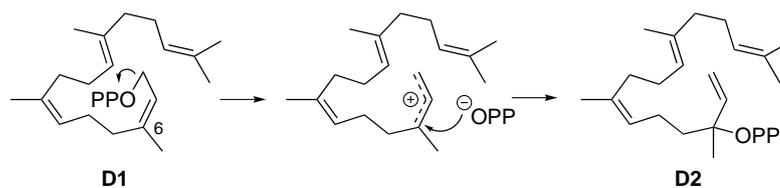


FIGURE 20 – Transposition allylique menant du GGPP au GLPP

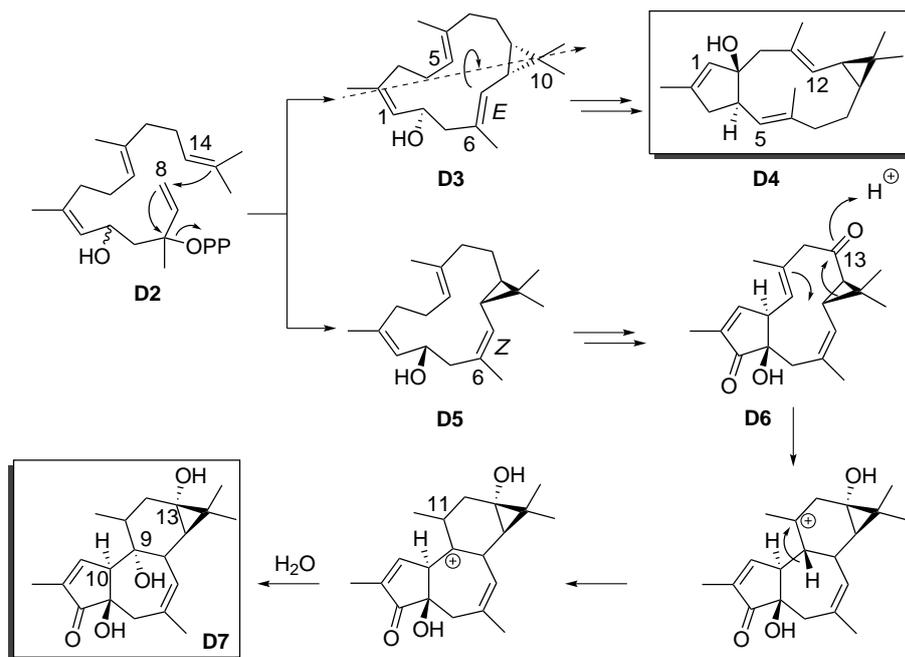


FIGURE 21 – Voies de biosynthèse possibles des lathyranes et des tiglianes

oxydation de la position 13 (**D6**), peut former le squelette tigliane (**D7**).

La voie D permet donc d'expliquer la formation de la liaison 8-14 et l'hydroxylation de la position 13 des tiglianes ainsi que l'hydroxylation opposé de la jonction de cycle A,B entre les tiglianes et les lathyranes.

Les ingénanes

Pour les ingénanes tels que l'ingénol, qui ne possèdent pas de groupement hydroxyl en position 13, la migration du cyclopropane pourrait être déclenchée par la formation d'un ion oxonium en C-13 (Figure 22). Contrairement aux tiglianes, le cation C-9 ne serait pas neutralisé par l'eau mais par une hybridation 1,2 me-

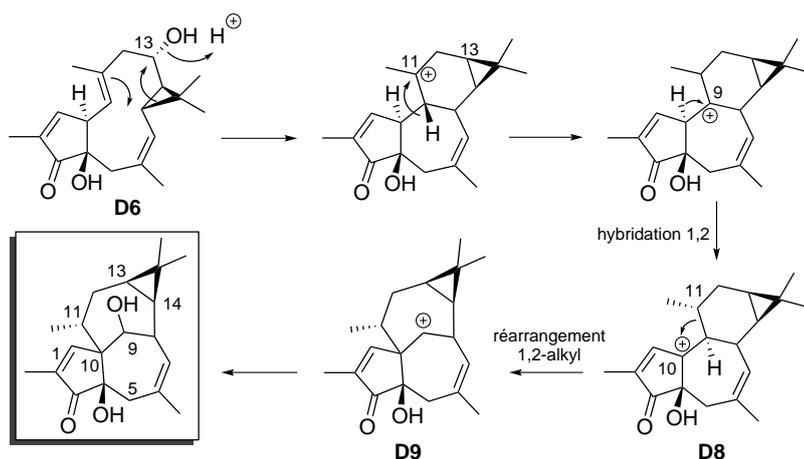


FIGURE 22 – Voie de biosynthèse possible des ingénanes

nant au cation **D8**. Celui-ci subirait ensuite un expansion de cycle médiée par un réarrangement 1,2-alkyl, conduisant au cation ingényl (**D9**).¹⁷ Une étude détaillée du réarrangement des tiglanes en ingénane pendant la synthèse totale de l'ingénol de Baran a mis en évidence l'importance de la présence du groupement hydroxyle en C-9 pour surmonter la barrière thermodynamique qu'implique la réaction, Il est donc improbable que les lathyranes (non fonctionnalisés en position 9) soit des précurseurs directs des ingénanes.⁴¹

Les rhamnfolanes

Finalement l'oxydation de **D6** en C-16 (numérotation tiglanes) pourrait déclencher un mode d'ouverture du cyclopropanes différent formant le cycle C typique des rhamnfolanes via l'attaque du côté opposé du C-8 cyclopropylique par la double liaison (Figure 23).¹⁷

Les daphnanes

Les daphnanes sont des molécules caractérisée par un tricyclic 5/7/6 qui dériverait du squelette tiglane par ouverture du cyclopropane. Ils sont souvent très fonctionnalisés et principalement isolés sous forme d'orthoester.⁴²

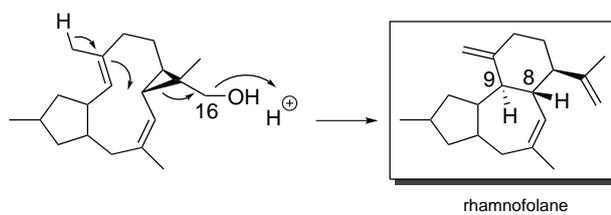


FIGURE 23 – Voie de biosynthèse possible des rhamnofolanes

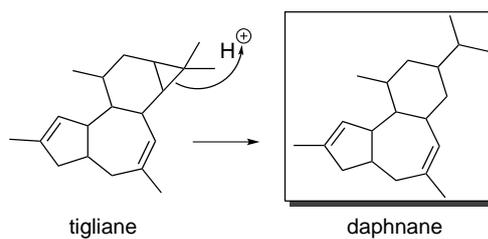


FIGURE 24 – Voie de biosynthèse possible des daphnanes à partir des tiglianes

Chapitre 3

Intérêts des diterpènes macrocycliques

Les sumériens et les akkadiens connaissaient les propriétés toxiques d'*E. heliosopa* et les propriétés médicinales de l'"euphorbium" (gomme provenant d'*E. resinifera*) sont documentées par dans les ouvrages d'Hippocrate, Galien et Dioscoride.⁴³ Au 18^{ème} siècle, Carl Linnée décrit le genre *Euphorbia* et ses indications dans le traitement des affections de la peau et comme purgatif gastro-intestinal. Plus tard, l'intérêt des DM d'Euphorbiaceae bio-actifs a débuté avec l'isolement et la caractérisation d'esters de phorbol provenant de *C. tiglium* puis des activités anti-tumorales des DM isolés de *E. esula*.^{43,44} Récemment, la découverte de l'ingénol mébutate (Picato[®]), un DM isolé d'*E. peplus*, a stimulé la recherche de nouveaux DM d'Euphorbiaceae. Un aperçu des nombreuses propriétés des DM est présenté dans ce chapitre.⁴⁵

3.1 Activité anti-"Multi-Drug-Resistance"

MDR désigne un phénomène au cours duquel la résistance à un médicament s'accompagne de résistances à différentes classes de médicaments. Le développement

FIGURE 25 – *Euphorbia lagascae*⁴⁹

de la MDR est une des premières causes d'échec des traitements anti-tumoraux, anti-bactériens et anti-fongiques. Le mécanisme principal de la MDR est la surexpression des glycoprotéines P (Pgp) dans la membrane plasmique des cellules résistantes.

Les Pgp sont des protéines transmembranaires d'efflux appartenant à la super-famille des transporteurs ABC. Ces pompes énergie-dépendantes provoquent la diminution de la concentration intracellulaire des xénobiotiques et induisent la résistance de la cellule au traitement.⁴⁶⁻⁴⁸

Une des stratégies les plus étudiées pour surmonter la MDR est la co-administration d'agents permettant de restaurer l'efficacité des molécules thérapeutiques. Un nombre considérable de réverseurs de la MDR ciblant les Pgp ont été décrits. Cependant, malgré des résultats encourageants *in vitro*, aucun n'est commercialisé à ce jour du fait de leur manque de spécificité (*e.g.* verapamil et cyclosporine), de leur toxicité (*e.g.* zosuguidar et tariquidar) ou de leurs mauvaises biodisponibilités (*e.g.* dexverapamil et elacridar).⁵⁰

Ces dernière années, la recherche de substances naturelles modulatrices de la MDR a permis de mettre en évidence la capacité des DM à restaurer la sensibilité des cellules MDR aux agents cytotoxiques (Figure 26).⁵¹ Les lathyranes et les jatrophanes sont les plus représentés. Ces deux genres structuraux possèdent des systèmes cycliques 5/12 et 5/11/3, respectivement, et sont généralement substitués par de nombreux groupement acyles. Les "euphorbia factor" L_{7a} et L₂ isolés d'*E. lathyris* montrent un taux de réversion de la résistance 5 fois supérieur au composé de référence, le verapamil.⁵² Les latilagascenes G, H et I, provenant d' *E. lagascae* (Figure 25) et d'un ester de jatrophane, l'euphotuckeyanol, isolé d' *E. tuckeyana*, possèdent des interactions synergiques avec l'épirubicine *in vitro*. Des travaux récents montrent également que certains esters de jatrophanes peuvent inhiber des transporteurs impliqués dans l'efflux des antifongiques chez *Candida albicans*.^{53,54} Dernièrement des études approfondies de structure-activité des lathyranes et des jatrophanes ont permis d'élaborer des composés anti-MDR prometteurs dont l'hydrophobie constitue une caractéristique clé.⁵⁰

3.2 Activité modulatrice des PKCs

Les phorboïdes possèdent des propriétés irritante et pro-tumorale lié à leur capacité à moduler l'activité des protéines kinases C (PKCs).

Les PKCs constituent une superfamille de protéines de type sérine-thréonine kinase qui jouent un rôle central dans la transduction de signaux cellulaires. Elles régulent de nombreuses fonctions des cellules telles que leur croissance, leur différenciation et l'apoptose. Physiologiquement, elles sont activées par le calcium et le diacylglycérol (DAG). Les PKCs sont constitués de quatre domaines (C1 à C4) parmi lesquels C1 joue un rôle crucial dans l'activation des PKCs en liant le DAG.⁵⁵

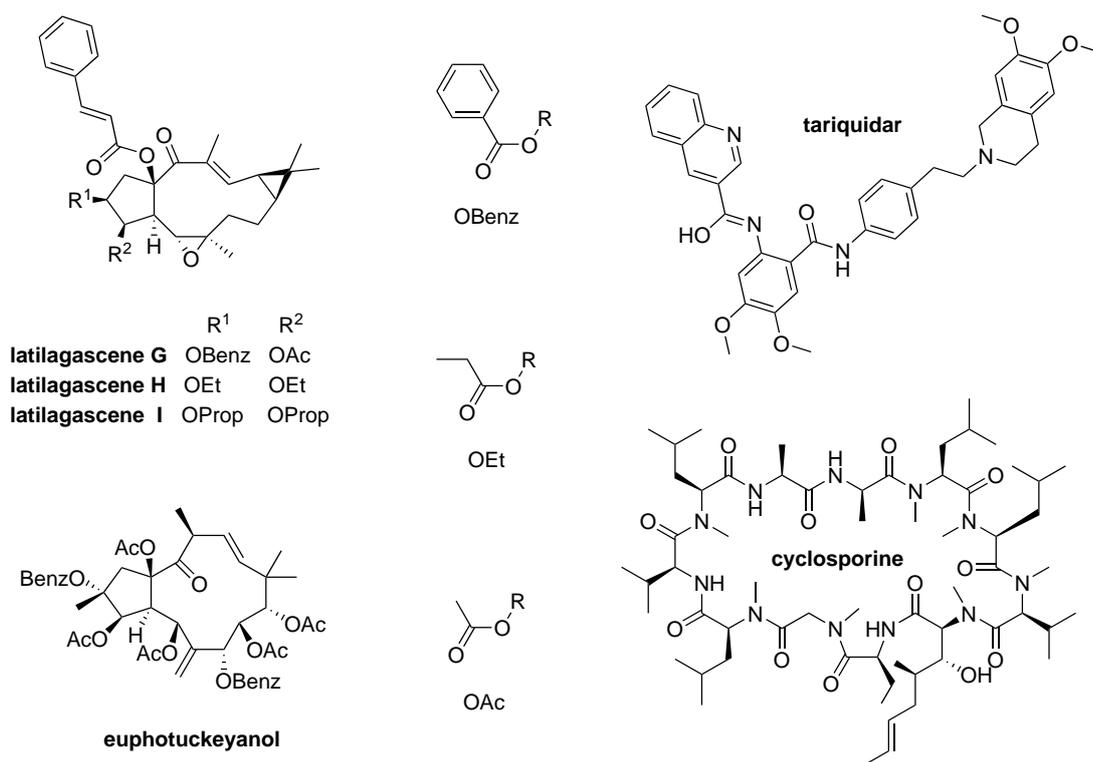


FIGURE 26 – Exemple de molécules inhibitrices de la MDR

3.2.1 Le TPA

Le 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate ou TPA est un diester de phorbol isolé de *C. tiglium*. Sa chaîne tétradécanoate, mime les chaînes grasses du DAG faisant du TPA un puissant agoniste des PKCs et un puissant promoteur de tumeur (Figure 27).

Durant les années 1990, des études ont montré que le TPA stimulait la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) tout en inhibant la formation des virions.^{56,57} Ces constatations d'apparence contradictoire sont en fait dues à l'activation des PKC par le TPA (IC_{50} anti-VIH-1 = 1 nM) qui a deux conséquences principales :

- la diminution de la population des récepteurs CD4, des protéines membranaires nécessaires à l'infection des cellules saines et à la production de nouvelles particules virales.

- l'activation de la voie NF- κ B induisant l'acétylation des histones et donc la transcription du génome viral latent.^{58,59}

C'est ainsi qu'est née la stratégie "kick and kill" consistant à supprimer les réservoirs viraux latents en évitant l'infection des cellules saines tout en éliminant le virus circulant.

3.2.2 La prostratine

Le 12-déoxyphorbol-13-acétate ou prostratine (Figure 27), est un tigliane analogue du TPA isolé pour la première fois de *Pimelea prostrata* (Thymelaeaceae) puis d'*Homalanthus nutans* (Figure 28).⁶⁰ Malgré une IC₅₀ anti-VIH-1 (1,3 μ M) environ mille fois supérieure, la prostratine possède le même mécanisme d'action que le TPA mais n'exerce pas d'effet pro-tumorale.^{59,61} Ce profil toxicologique intéressant, lui a valu d'entrer en phase clinique en 2014 pour le traitement du VIH.⁶² Toutefois aucune information n'est disponible sur l'avancée des études. D'autre part, le TPA et la prostratine possèdent également des propriétés inhibitrices de la réplication du virus du chikungunya (CHIKV) bien que ce virus soit totalement différent du VIH.⁶³

3.2.3 Autres squelettes antiviraux

D'autres squelettes de DM agonistes des PKCs non tumorigènes ont également été étudiés pour leur activité inhibitrice de la réplication du VIH-1 ; c'est le cas des lathyranes de *E. lactea* et *E. laurifolia* ou encore des jatrophanes de *E. hyberna* dont le SJ23B est dix fois plus puissant que la prostratine.⁶⁴ Toutefois, des travaux non publiés et menés à l'ICSN suggèrent que cette substance n'était pas pure et que l'activité pourrait être due à des esters de déoxyphorbols résiduels. Récemment, la capacité à inhiber la réplication du CHIKV et du VIH par d'autres tiglianes et ingénanes a été démontrée à des concentrations nanomolaires. Une relation linéaire entre les résultats des deux tests a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle les

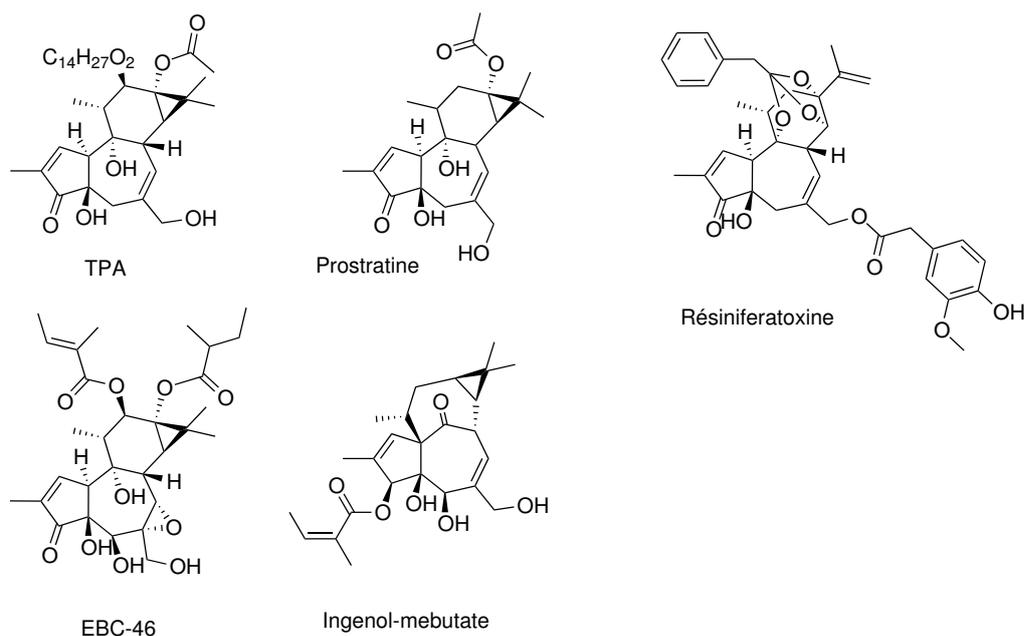


FIGURE 27 – Exemple de DM modulateurs des PKCs

PKCs sont impliquées dans le cycle de réplication du CHIKV.⁶⁵ De la même manière des daphnanes orthoesters ont montré des activités inhibitrices du CHIKV et du virus de la Dengue à des concentrations micromolaires.⁶⁶ Les DM peuvent donc être un bon point de départ pour l'élaboration de nouveaux médicaments antiviraux.

3.2.4 L'ingénol mébutate

Les ingénanes sont des phorboïdes possédant des propriétés pro-inflammatoires et induisant la différenciation cellulaire. D'un point de vue structural, ils se rapprochent des esters de phorbol. Cependant, le cyclohexane est remplacé par un cycloheptane suite à un réarrangement intramoléculaire, et la position de certains esters peuvent être différentes. Le chef de file de cette classe de composés est l'ingénol mébutate isolé d'*E.peplus* (Figure 27).⁶⁸ Son profil pro-inflammatoire dénué d'effet promoteur de tumeur lui a valu d'être le sujet d'études approfondies mettant en évidence son pouvoir inducteur de l'apoptose dans les tumeurs de la peau. L'effet pro-apoptotique causé par l'activation des PKCs, associé au recrutement des neutrophiles lors de

FIGURE 28 – *Homalanthus nutans*⁶⁷

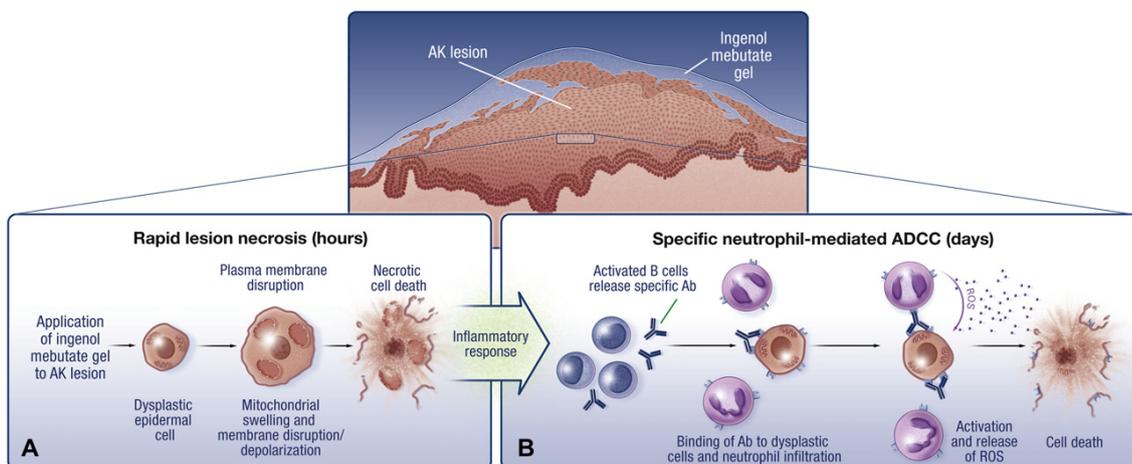
l'application cutanée, conduit à une nécrose du tissu puis à sa guérison (Figure 30).^{45,69} À l'heure actuelle l'ingénol mébutate est commercialisé sous le nom de Picato en Europe et aux Etats-Unis où il est indiqué dans le traitement des kératoses actiniques.⁵⁵

3.2.5 l'EBC 46

L'EBC 46 est un tigliane isolé des baies de *Fontainea picrosperma*, une Euphorbiacae australienne. Chez des modèles de tumeurs solides murines, l'injection intra-tumorale d'EBC 46, provoque une nécrose hémorragique PKC-dépendante rapide menant à une guérison complète. La société QBiotics, dépositaire du brevet, conduit actuellement des études cliniques de phase I et II chez l'Homme sur des patients atteints de mélanomes, carcinomes à cellules squameuses, carcinomes à cellules basales, et adénocarcinomes du sein. QBiotics mène également des études chez le chat, le chien et le cheval pour le traitement de tumeurs solides inopérables. La société prévoit ainsi de commercialiser des préparations topiques et injectables pour le secteur vétérinaire.⁷¹

FIGURE 29 – *Croton tiglium* L.⁷⁰

The Mechanism of Action of Ingenol Mebutate Gel

FIGURE 30 – Mécanisme d'action de l'ingénol mébutate.⁵⁵

3.3 Autres activités

La résiniferatoxine un DM à squelette daphnane isolé d'*Euphorbia resinifera* est un activateur de TRPV1, un récepteur ionotropique impliqué dans la perception de la douleur. Il s'agit donc d'une molécule intéressante pour le développement d'analgésique à longue durée d'action.⁷²

De nombreux DM possédant des squelettes carbonés variés (*e.g.* casbane, ingé-nane, tigliane, lathyrane, myrsinane, et jatrophane) ont des effets antiprolifératifs modérés à élevés sur différentes lignées de cellules cancéreuses humaines (*e.g.* leucémie myéloïde chronique ; carcinomes gastrique, pancréatique, du poumon...). Certains d'entre eux possèdent des activités cytotoxiques tandis que d'autres induisent l'apoptose : différents mécanismes d'action ont été proposés :

- inhibition de la topoisomérase II
- de la synthèse de l'ADN
- modulation des PKC
- induction de l'apoptose soit par l'inhibition de IL-6 et STAT3 ou par l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B⁹

Sur des modèles *in vitro* de vasoconstriction, certains lathyranes possèdent également la capacité à relaxer le muscle lisse de façon comparable à celle du verapamil.⁷³ Des myrsinanes et pré-myrsinanes ont démontré des activités neuroprotectrices *in vitro* et certains DM possèdent des propriétés immunomodulatrices, anti-bactériennes et pesticides.^{9,74}

Deuxième partie

Travaux personnels : étude phytochimique de *Sandwithia* *guyanensis*

Chapitre 1

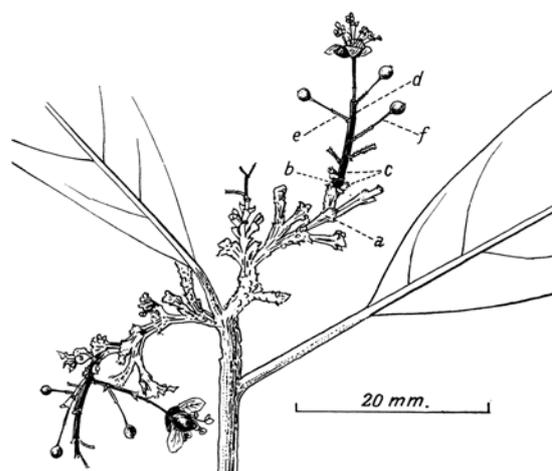
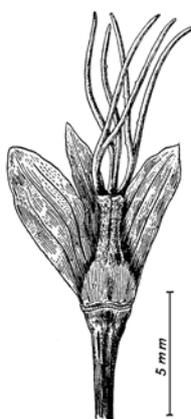
Description et intérêt de

S.guyanensis

1.1 Le genre *Sandwithia*

S.guyanensis est une Crotonoideae appartenant à la tribu des Aleuritideae. Les Crotonoideae se distinguent des autres groupes par des filaments staminaux infléchis. La plupart des espèces sont lépidotes, caractérisées par une inflorescence thyrsoïde et possèdent des laticifères non articulés produisant un latex clair, rougeâtre ou jaune.⁷⁵

Le genre *Sandwithia* est très peu décrit, il est représenté par deux espèces, *S.heterocalyx* et *S.guyanensis*, cette dernière ayant été décrite pour la première fois en 1932 par le botaniste hollandais Joseph Lanjouw. Celui-ci inaugura par la même occasion un nouveau genre qui porte le nom du collecteur, son collègue, le botaniste britannique Noël Yvri Sandwith.^{76,77} Il s'agit d'un arbre d'environ 6 m poussant dans les forêts équatoriales d'Amérique du sud. Les fleurs mâles, de couleurs blanches sont constituées de 2 ou 3 sépales et de 4 pétales. Les fleurs femelles, vertes, sont tétramères et apétales (Figures 31 et 32). Le fruit est vert, triloculaire typique des Euphorbiaceae.

FIGURE 31 – Inflorescence de *S. guyanensis*FIGURE 32 – Fleur femelle sans pétale de *S. guyanensis*

1.2 Activité antivirale de l'extrait de *S. guyanensis*

Lors du criblage sur la réplication du virus du chinkungunya, l'extrait d'écorce de *S. guyanensis* a démontré une des concentrations efficaces médianes les plus faibles (*i.e.* 7.9 µg/mL). Cette plante a été étudiée par Jacobs en 1987, cependant cette étude ne s'est limitée qu'à l'isolement d'une seule molécule : l'acide cypérenoïque.⁷⁸ L'activité antivirale de l'extrait et le très faible nombre d'espèces de ce genre, associés aux avancées récentes en matière de techniques séparatives et d'analyse structurale, ont permis de réaliser une étude phytochimique plus complète.

Chapitre 2

Les diterpènes de *S.guyanensis*

L'analyse des composés (17 nouveaux et 2 connues) a permis de caractériser 6 squelettes différents. Pour chaque série chimique, l'analyse d'un chef de fil sera d'abord détaillée puis complétée par des observations marquantes notées lors de l'élucidation structurale des analogues. Les descriptions sont volontairement courtes car elles s'appuient sur des données cristallographiques.

2.1 Extraction et purification

L'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) de l'écorce broyée de *S. guyanensis* a été solubilisé dans l'acétonitrile (ACN) puis partitionné avec du *n*-heptane afin d'obtenir un extrait ACN délipidé. Le fractionnement de cet extrait par chromatographie flash sur silice a donné 19 fractions. Les fractions F3 à F5, F10, F11 et F13 à F15, ayant montré les activités anti-CHIKV les plus fortes ($0,6 < EC_{50} < 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) et la fraction inactive F6, ont été séquentiellement purifiées par HPLC semi-préparative et/ou analytique, afin d'obtenir les composés **1** à **19**. L'élucidation structurale de ces composés a été menée par une analyse détaillée des données de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de spectrométrie de masse, et les configurations absolues des composés **1**, **3**, **4** à **6** et **12** ont été confirmées par radiocristallographie.

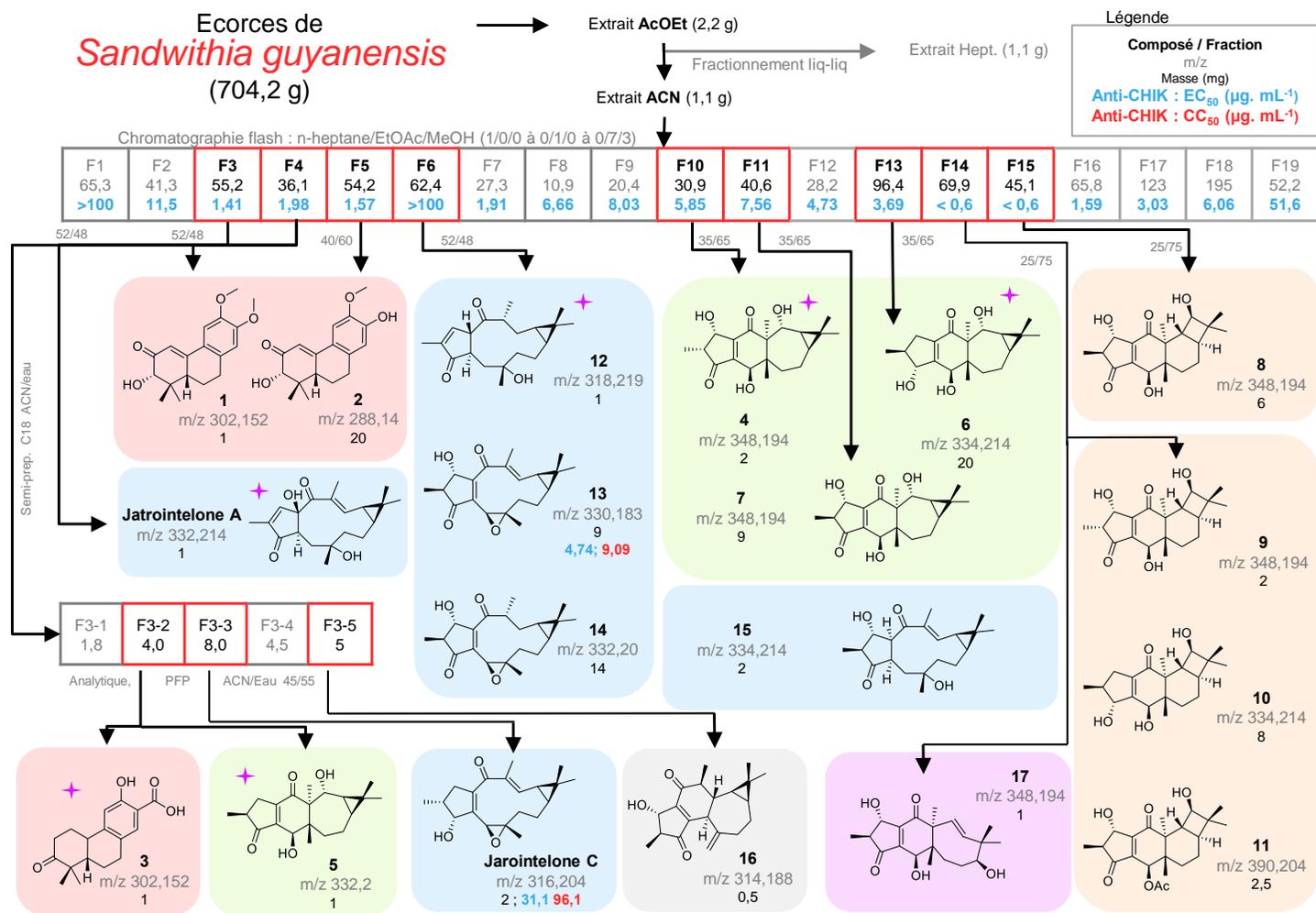


FIGURE 33 – Schéma de fractionnement de l'extrait d'écorces de *S.guyanensis*

2.2 Caractérisation structurale

2.2.1 Composés 1 à 3

Le spectre de masse HRESIMS(+) du composé **1** a montré un ion sodium $[M+Na]^+$ à m/z 325,1422 correspondant à la formule brute $C_{18}H_{22}O_4$. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a permis de proposer une structure de type phénanthrénoïde proche de la domohinone avec comme différence l'absence de carbonyle en position 7 (δ_C 30,1; δ_H 2,88 2H), et un groupe méthoxyle en position 13 (δ_C 56,2; δ_H 3,89) (Tableau II, Figure 34, Annexe B : Figure 50).⁷⁹ La position relative des substituants a été déterminée selon les corrélations observées en NOESY.

Le spectre de masse HRESIMS (+) du composé **2** a révélé un ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 289,1440 correspondant à la formule brute $C_{17}H_{21}O_4$. L'analyse des données spectroscopiques a permis d'affirmer que **2** est un analogue de **1** dont le groupement méthoxyle est remplacé par un hydroxyle (Annexe B : Figure 51). La configuration relative de **2** a été assignée sur la base du spectre NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy) et de la comparaison des données spectroscopiques de **1** et de la domohinone.

Le formule brute du composé **3** a été déterminée par HRESIMS (+)($[M+H]^+$ m/z 303,1601) comme étant $C_{18}H_{22}O_4$. Les données de RMN 1H et ^{13}C ont permis de montrer que **3** est un analogue de **1** et **2**. Par comparaison avec **1** et **2**, la présence d'un groupement acide carboxylique en position 15 a été confirmée par des corrélations HMBC (heteronuclear multi-bond connectivity) entre un carbonyle (C-15, δ_C 173,1) et les protons H-11 et H-14 et entre un proton déblindé (H-15, δ_H 10,10) et les carbones C-12, C-13 et C-14. Des HMBC entre ce proton et les carbones C-12, C-13 et C-14 ont rendu possible la localisation du carboxyle en position 13 (Annexe B : Figure 52, et Annexe C : Figure 67). L'obtention d'un cristal et son analyse par RX a donné accès à la configuration absolue des deux centres asymétriques en positions 5 et 10 (Figure 35).

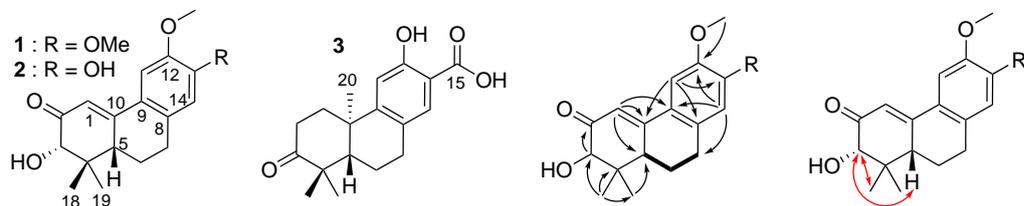


FIGURE 34 – Structures des composés 1 à 3. Corrélations COSY (gras), HMBC (noir) et NOESY (rouge) clés des composés 1 et 2.

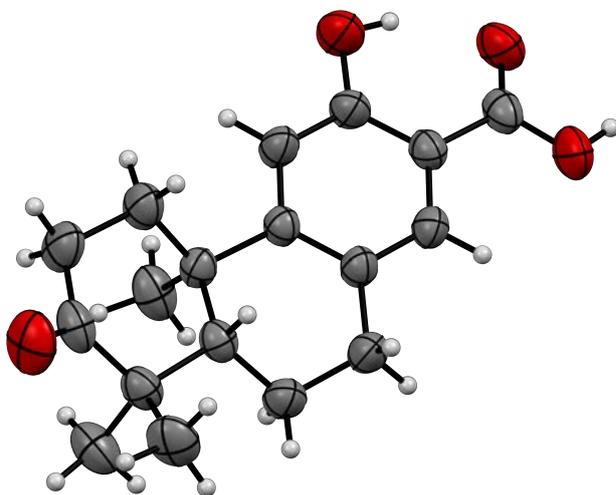


FIGURE 35 – Vue ORTEP du composé 3.

Tableau II – Données RMN ^1H des composés **1**, **2** et **3** (500 MHz, CDCl_3).

no.	1	2	3
1 α	6.64, d (2.6)	6.62, d (2.6)	2.46, ddd (13.5, 7.5, 4.5)
1 β	-	-	1.97, ddd (13.5, 10.0, 7.5)
2 α	-	-	2.60, ddd (16.0, 7.5, 4.2)
2 β	-	-	2.72, ddd (16.0, 10.0, 7.5)
3	4.04, s	4.04, s	-
5	2.59, m	2.58, ddd (13.0, 3.5, 3.5)	1.90, dd (12.0, 2.5)
6 α	2.13, m	2.10, dtd (13.0, 3.5, 3.5)	1.84, m
6 β	1.63, m	1.60, dtd (13.0, 12.5, 5.2)	1.80, ddd (12.0, 12.0, 6.0)
7 α	2.88, m	2.84, m	2.82, ddd (16.5, 12.0, 7.0)
7 β	-	-	2.97, ddd (16.5, 5.4, 1.5)
11	7.22, s	7.22, s	7.62, s
14	6.65, s	6.73, s	6.90, s
15	-	-	-
18	1.31, s	1.29, s	1.18, s
19	0.79, s	0.78, s	1.15, s
20	-	-	1.31, s
12-OMe	3.92, s	3.91, s	-
13-OMe	3.89, s	-	-
3-OH	3.84, sl	3.85, sl	-
13-OH	-	5.96, sl	-
15-OH	-	-	10.10, s

2.2.2 Composés 4 à 7

Le spectre HRESIMS (+) du composé **4** indique un adduit sodium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 371,1840 correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ soit 7 équivalents d'insaturation. On peut déduire de l'analyse des données RMN la présence de 20 carbones : 5 méthyles, 2 carbonyles, 5 carbones quaternaires (dont 2 éthyléniques), 6 méthines (3 oxygénées) et 2 méthylènes (Figure 2.2.2, Tableaux III et VII, Annexe B : Figure 53). Ces éléments associés aux données de la littérature ont mené à l'identification d'un squelette tétracyclique proche de l'euphoractine B.⁸⁰ Cependant, aucun groupement cinnamoyl n'a été détecté. Les systèmes de spin observés en COSY (correlation spectroscopy) (H-1/H-2/H-16 et de H-7 à -H12) ont suggéré que les positions 1 (δ_H 5,14) et 12 (δ_H 4,05) étaient hydroxylées (Annexe C : Figure 68). L'obtention et l'analyse d'un cristal par RX a permis de confirmer la structure de **4** et de déterminer sa configuration absolue. (Figure 37)

Un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 355,1886 sur le spectre HRESIMS (+) du composé **5** a permis de lui attribuer la formule brute $C_{20}H_{28}O_4$, soit un oxygène de moins que le composé **4**. Les données de RMN 1D et 2D ont montré que **5** différait de **4** par le remplacement du OH-1 par un méthylène (δ_C 31,8; δ_H 2,44, 2,80) (Annexe B : Figure 54). La configuration absolue de **5** a été déterminée par NOESY et analyse d'un cristal par diffraction des RX.

Le spectre HRESIMS (+) du composé **6** révèle un adduit sodium $[M+Na]^+$ 357,2045 m/z correspondant à la formule brute $C_{20}H_{30}O_4$. La perte d'un équivalent d'insaturation associé à l'oxyméthine additionnelle observée par RMN du ^{13}C et HSQC (heteronuclear single quantum coherence) suggère le remplacement d'un carbonyle par un groupement hydroxyle. L'HMBC entre H-16 et un carbone à δ_C 83,1 a confirmé la présence d'un hydroxyle en position 3 (Annexe B : Figure 55 et Annexe C : Figure 69). De la même manière que pour **5**, la configuration absolue a été obtenue par analyse cristallographique.

Les données de HRESIMS (+) et de RMN montrent que le composé **7** possède la même masse moléculaire ($[M+Na]^+$ 371,1837 m/z) et la même structure que **4** à l'exception de la constante $^3J_{H-1/H-2}$ qui est de 6,0 Hz chez **4** au lieu de 2,6 Hz chez **7** (Annexe B : Figure 56). Ces valeurs sont similaires à celles observées pour **5** ($^3J_{H-1\alpha/H-2} = 6,4$ Hz, $^3J_{H-1\beta/H-2} = 2,2$ Hz) dont la configuration a été obtenue par cristallographie et à celles rapportées pour la lagaspholone A ($^3J_{H-1\alpha/H-2} = 6,5$ Hz, $^3J_{H-1\beta/H-2} = 2,0$ Hz) et la curcusone A ($^3J_{H-1\alpha/H-2} = 6,8$ Hz, $^3J_{H-1\beta/H-2} = 2,3$ Hz), suggérant la configuration *trans* de la liaison 1-2. En comparant les données de RMN du composé **7** à celles de **4**, **5** et **6**, il est possible de déduire que le Me-17 de **7** est orienté en β .^{81,82} Ainsi, l'observation d'interactions NOE entre H-1 et les Me-16 et Me-17 ont permis d'assigner l'orientation α à l'OH-1 et l'orientation β au Me-16 (Annexe C : Figure 70).

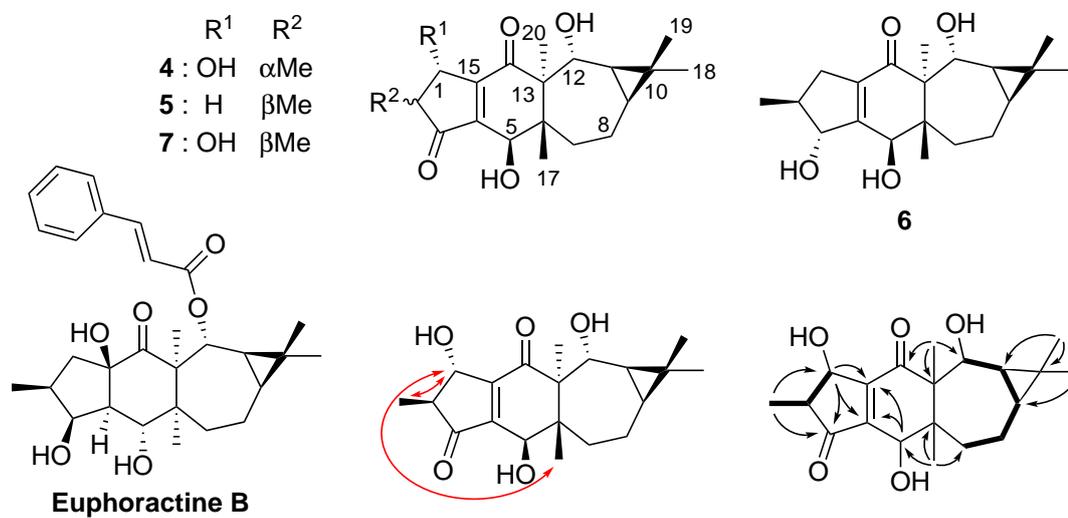


FIGURE 36 – Structures des composés 4 à 7. Corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés des composés 4 et 7. Corrélations NOESY (rouge) clés du composé 7

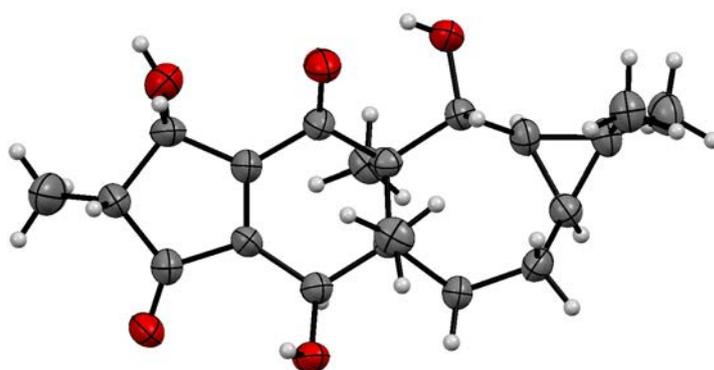


FIGURE 37 – Vue ORTEP du composé 4 obtenue par cristallographie

Tableau III – Données RMN ^1H des composés **4** à **7** (500 MHz, MeOD (**4**), CDCl_3 (**5** à **7**)).

no.	4	5	6	7
1 α	5,14, d (6,0)	2,80, ddd (19,0, 6,4, 3,5)	2,10, m	4,82, sl
1 β	-	2,44, ddd (19,0, 2,7, 2,2)	2,59, m	-
2 α	2,59, dq (6,0, 7,4)	2,60, qdd (7,3, 6,4, 2,2)	2,15, q (7,0)	2,52, qd (7,5, 2,6)
3	-	-	4,55, d (7,0)	-
5	4,53, s	4,66, dd (3,0, 3,0)	4,53, s	4,70, sl
7 α	1,77, m	1,73, dd (13,5, 12,5)	1,71, dd (14,2, 12,5)	1,71, dd (13,5, 12,5)
7 β	2,04, dd (14,4, 7,0)	2,10, dd (13,5, 7,0)	1,95, dd (14,2, 7,0)	2,10, dd (13,5, 7,0)
8 α	1,79, m	1,80, ddd (14,6, 7,4, 7,0)	1,79, ddd (14,6, 7,5, 7,0)	1,81, dd (14,7, 7,5, 7,0)
8 β	1,04, m	0,99, ddd (14,6, 12,5, 11,0)	0,99, ddd (14,6, 12,5, 11,0)	0,97, m
9	0,82, m	0,77, ddd (10,5, 9,5, 7,0)	0,74, ddd (11,0, 9,0, 7,5)	0,76, m
11	0,56, dd (9,4, 9,4)	0,57, dd (9,5, 9,5)	0,55, dd (9,6, 9,0)	0,53, dd (9,4, 9,4)
12	4,05, d (9,4)	4,01, d (9,0)	3,94, d (9,0)	4,02, d (9,0)
16	1,14, d (7,0)	1,26, d (7,5)	1,20, d (7,0)	1,30, d (7,5)
17	0,87, s	0,88, s	0,84, s	0,87, s
18	1,10, s	1,12, s	1,10, s	1,10, s
19	1,13, s	1,13, s	1,10, s	1,12, s
20	1,37, s	1,38, s	1,40, s	1,37, s

2.2.3 Composés 8 à 11

Le spectre HRESIMS (+) de **8** montre un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 371,1841 correspondant à la même formule brute que **4**, $C_{20}H_{28}O_5$. Cependant, des HMBC de H-18 et H-19 vers C-9, C-10 et C-11 ainsi qu'un système de spin de H-7 à H-11 observé en COSY révèle une structure tétracyclique 5/6/6/4 proche de celles isolées de *E.micractina* (Annexe C : Figures 71 et 72).⁸⁰ La configuration relative de **8** à été établie grâce à l'analyse des effets NOE . Comme pour l'euphoractine A et ses analogues, Me-18 et Me-19 ont été assignés en α et en β respectivement.⁸³ Ainsi, les corrélations croisées H-19/H-12, H-12/H-17, H-17/H-1 et H-1/H-16 indiquent l'orientation β de H-12, Me-17 et Me-16 et l'orientation α de OH-1. Tandis que les corrélations H-18/H-11, H-11/H-9, H-20 et H-20/H-5 ont permis de déterminer l'orientation β de OH-11 et OH-5 et l'orientation α de H-9 et Me-20 (Figures 38 et 39, Tableaux IV et VII, Annexe B : Figure 57, Annexe C : Figure 73).

Comme le montrent les données de spectrométrie de masse et de RMN, le composé **9** possède la même structure que **8** (m/z 371,1854, $C_{20}H_{28}O_5$). Cependant, l'augmentation de la constante de couplage $^3J_{H-1/H-2}$ de 2,0 Hz (**8**) à 6,0 Hz (**9**) suggère que la liaison 1-2 possède une configuration *cis* chez **9** (Annexe B : Figure 58). Cette hypothèse est appuyée par une forte corrélation H-1/H-2 observée sur le spectre de NOESY. Par comparaison aux RMN de **4**, **5**, et **6**, le Me-17 est orienté en β . Ainsi les effets NOE entre H-1 et H-17 indiquent que Me-16 et OH-1 sont orientés en α (Annexe C : Figure 74).

Le spectre HRESIMS (+) du composé **10** montre un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 357,2061 correspondant à la formule brute $C_{20}H_{30}O_4$. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D révèle une structure similaire à celles de **8** et **9**. Néanmoins, les corrélations H-1/H-2/H-16 et H-2/H-3 observées sur le spectre 1H - 1H COSY et les informations issues du spectre HMBC, montrent la présence d'une oxyméthine en position 3 (δ_C 83,7; δ_H 4,61) et d'un méthylène en position 1 (δ_C 34,4; δ_H 2,66, 2,03, 2H) (Annexe B : Figure 59 et Annexe C : Figure 75).

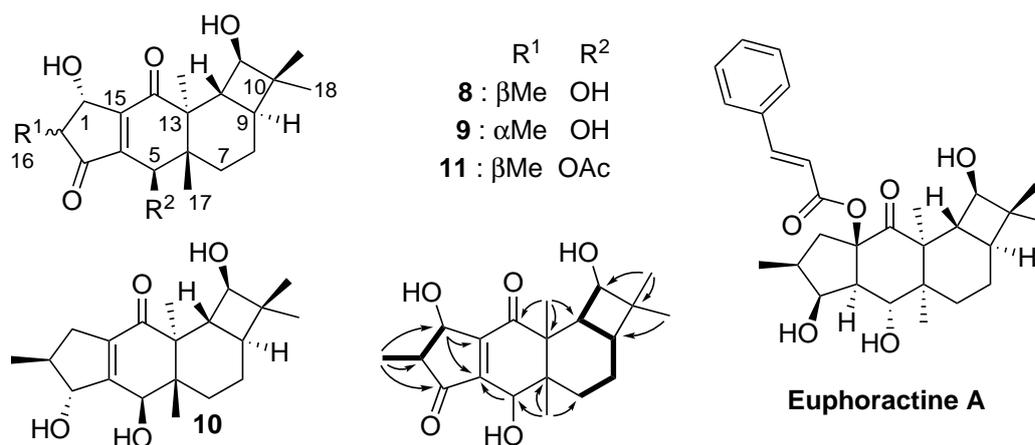


FIGURE 38 – Structures des composés 8 à 11. Corrélations COSY (gris) et HMBC (noir) clés des composés 8 et 9.

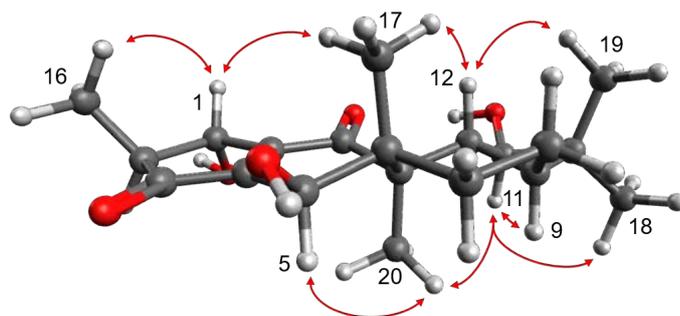


FIGURE 39 – Effets NOE clés du composé 8.

Le composé **11** de formule brute $C_{22}H_{30}O_6$ ($[M+Na]^+$ m/z 413,1944), correspond à l'analogue acétylé en position 5 du composé **8**. La position du groupement acétylé est déduite de l'observation d'une HMBC entre H-5 et trois protons à 2,17 ppm et le carbone de l'ester carboxylique à 170,9 ppm. (Annexe B : Figure 60 et Annexe C : Figure 76)

2.2.4 Composés 12 à 17

Le composé **12** dont le spectre HRESIMS (+) indique un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 341,2096 correspondant à la formule brute $C_{20}H_{30}O_3$, possède des caractéristiques structurales proches de la jatrointelone A, un lathyrane isolée de *J.*

Tableau IV – Données RMN ^1H des composés **8** à **11** (500MHz CDCl_3)

no.	8	9	10	11
1 α	4,76, d (2,0)	5,20, d (6,0)	2,66, ddt (15,8, 7,5, 1,9)	4,75, dd (2,5, 2,5)
1 β	-	-	2,03, ddt (15,8, 7,5, 2,6)	-
2	2,54, qd (7,5, 2,0)	2,74, qd (7,5, 6,0)	2,17, qd (7,5, 6,0)	2,48, qd (7,5, 2,5)
3	-	-	4,61, dd (7,1, 1,7)	-
5	4,78, sl	4,75, sl	4,64, sl	6,05, sl
7 α	1,57, m	1,58, m	1,55, m	1,49, m
7 β	1,88, m	1,88, m	1,72, brd (13,5)	1,59, m
8 α	1,42, m	1,42, m	1,43, tdd (12,3, 12,3, 4,1)	1,52, m
8 β	1,54, m	1,54, m	1,51, m	1,39, m
9	1,13, m	1,13, m	1,10, m	1,14, m
11	3,52, d (8,5)	3,52, d (8,5)	3,48, d (8,0)	3,54, d (8,3)
12	2,09, dd (13,0, 8,5)	2,09, dd (13,0, 8,5)	1,97, dd (13,0, 8,5)	2,06, dd (13,0, 8,3)
16	1,31, d (7,5)	1,23, d (7,5)	1,22, d (7,0)	1,28, d (7,0)
17	0,99, s	1,00, s	0,95, s	1,03, s
18	1,11, s	1,12, s	1,10, s	1,11, s
19	1,08, s	1,08, s	1,06, s	1,07, s
20	1,22, s	1,19, s	1,20, s	1,31, s
5-OAc				1,03, s 2,17, s

integerrima.⁸⁴ Toutefois, l'analyse par RMN indique l'absence de la double liaison 12-13. De plus, le système de spin H-1/H-15/H-4/H-5 observé sur le spectre ^1H - ^1H COSY révèle la présence de 2 méthines sp^3 en positions 4 et 15 dont la constante de couplage ($^3J_{\text{H-4/H-15}} = 2,5$ Hz) et l'absence d'effet NOE évoquent une jonction de cycle de configuration *trans*. (Annexe B : Figure 61 et Annexe C : Figure 77). L'obtention d'un cristal et son analyse par RX a permis de confirmer la configuration absolue de **12** (Figures 40 et 2.2.4, Tableaux V et VII).

Le spectre HRESIMS (+) du composé **13** révèle un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 331,1933 correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3$. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a permis de proposer une structure similaire à celle de la jatrontelone C avec comme principales différences la présence d'une oxyméthine (δ_C 75,9; δ_H 4,69) et d'un carbonyle (δ_C 205,8) en positions 1 et 3, respectivement (Annexe B : Figure 62 et Annexe C : Figure 78).⁸⁴ La configuration relative de **13** a été établie par comparaison des données de RMN 1D et de NOESY avec celle de la jatrontelone C.

Le spectre HRESIMS (+) du composé **14** montre un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 333,2069 qui correspond à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_4$ et suggère la réduction d'une double liaison par comparaison au composé **13**. L'HMBC entre H-20 et deux carbones sp^3 (δ_C 26,7 et 44,2) indiquent que C-12 et C-13 sont reliés par une simple liaison (Annexe B : Figure 63 et Annexe C : Figure 79). L'analyse des données de NOESY et la comparaison aux données précédemment décrites (composés 12, 13 et jatrontelone C) ont permis de déterminer la configuration relative du composé **14**.

Le spectre HRESIMS (+) du composé **15** révèle un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 335,2222 correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a permis de proposer une structure similaire à celle de **13** avec comme principales différences, la présence d'un méthylène (δ_C 31,1; δ_H 2,08, 2,32 2H) en position 5 signifiant l'ouverture de l'époxyde et la présence de deux méthines en position 4 (δ_C 54,1; δ_H 2,32) et 15 (δ_C 54,6; δ_H 3,59) indiquant l'absence de la double

liaison en C-4/C-15 observée chez **13** (Annexe B : Figure 64). Par comparaison avec le composé **12**, la corrélation NOESY H-4/H-15 et la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-4/H-15}}$ de 13,0 Hz suggère la configuration *cis* de la jonction de cycle (Annexe C : Figure 81). Ce composé constitue une réelle curiosité. C'est en effet la première fois qu'une jonction de cycle A/B *cis* est observé chez les lathyranes dont il existe environ une centaine d'analogues (jatrophanes inclus).

Tableau V – Données RMN ¹H des composés **12** à **17** (500MHz CDCl₃)

no.	12	13	14	15
1	7,07, sl	4,69, d (1,5)	4,58, d (2,0)	4,06, dd (9,4, 9,4)
2	-	2,46, qd (7,5, 1,5)	2,46, ddd (14,8, 7,5, 2,0)	2,34, m
4	3,10, ddd (7,5, 2,5, 1,5)	-	-	2,32, d
5 α	2,09, d (15,0)	3,64, s	3,77, s	2,08, dd (10,0, 1,9)
5 β	1,52, dd (15,0, 7,0)			1,62, dd (15,6, 5,5)
7 α	1,42, m 2H	1,14, m	2,36, ddd (13,5, 6,0, 1,0)	1,43, m
7 β		2,35, dd (13,0, 12,0)	1,31, dd (13,5, 13,5)	1,43, m
8 α	1,42, m	1,14, m	1,82, ddd (15,0, 6,0, 1,0)	
8 β	0,49, d (11,0)	1,30, m	0,98, m	0,61, ddd (13,0, 12,5, 11,0)
9	0,28, dd (9,5, 9,5)	1,43, m	0,15, dd (9,0, 9,0)	0,99, ddd (12,5, 8,6, 3,4)
11	0,59, dd (11,0, 9,5)	1,65, dd (11,0, 8,0)	0,53, ddd (10,0, 9,0, 4,8)	1,35, dd (9,7, 9,3)
12 α	1,99, ddd (15,3, 5,6, 1,6)	6,04, d (11,0)	2,08, ddd (15,0, 10,0, 4,5)	5,54
12 β	1,71, ddd (15,0, 12,0, 3,0)	-	1,16, m	-
13	3,14, m	-	3,18, m	-
15	3,83 td (2,5, 2,5)	-	-	3,59, ddd (13,0, 9,4, 5,5)
16	1,78, s	1,21, d (7,5)	1,24, d (7,5)	1,20, d (7,0)
17	1,21, s	1,26, s	1,27, s	1,16, s
18	0,99, s	1,22, s	0,99, s	1,11, s
19	0,83, s	1,11, s	0,87, s	1,16, s
20	1,22, d (7,0)	2,02, s	1,13, d (7,0)	2,07, s
1-OH		4,61, sl	-	-

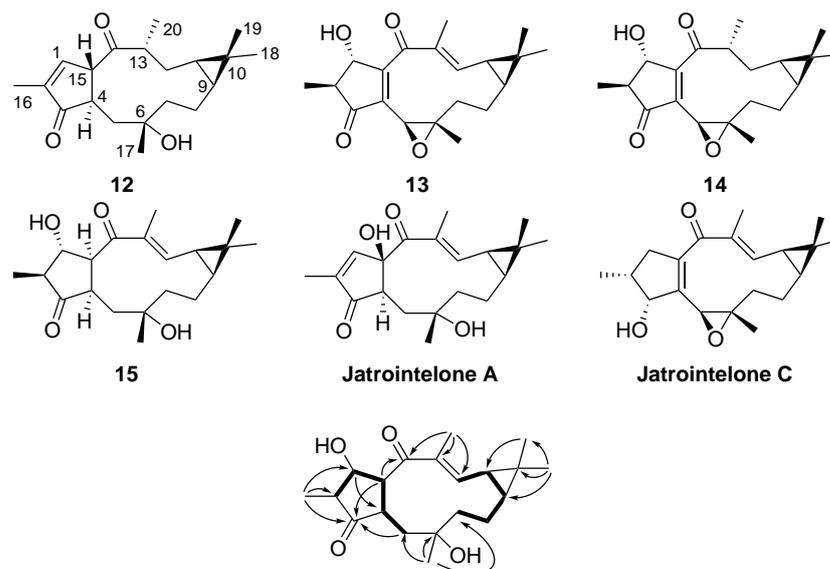


FIGURE 40 – Structures des composés **12** à **15** et des jatroitelones A et C. Corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé **15**.

Les données de HRESIMS (+) ont permis de déterminer la formule brute du composé **16** ($[M+H]^+$ m/z 333,2069, $C_{20}H_{26}O_3$), dont la structure rappelle celle des jatrophanes. Les spectre de RMN 1D et 2D ont permis de confirmer que **16** était le dérivé hydroxylé en position 1 du sikkimenoïde A (Annexe B : Figure 65).⁸⁵ La configuration relative de **16** a été élucidée par l'analyse des effets NOE et la comparaison des déplacements chimiques et constantes de couplage observés sur les spectres RMN 1H et ^{13}C avec ceux du sikkimenoïde A (Figures 42 et 43, Tableaux VI et VII).

Le composé **17** montre un aduit sodium en HRESIMS (+) ($[M+Na]^+$ m/z 371,1832) correspondant à la même formule brute que **4**, **8** et **9** ($C_{20}H_{28}O_5$). Toutefois, l'élucidation structurale par RMN révèle un tricyclic 5/6/8 typique des euphactines isolées de *E.micractina*.⁸⁶ Contrairement à l'euphactine A, aucun groupement benzoyle n'a été détecté chez **17** qui est hydroxylée en position 1 (δ_C 73,7, δ_H 4,85). Des HMBC entre H-5 et deux carbones sp^2 (δ_C 156,3, 147,5) indique une insaturation entre C-4 et C-15. La configuration relative du composé **17** a été obtenue par l'analyse des corrélations NOESY et par comparaison aux données disponibles

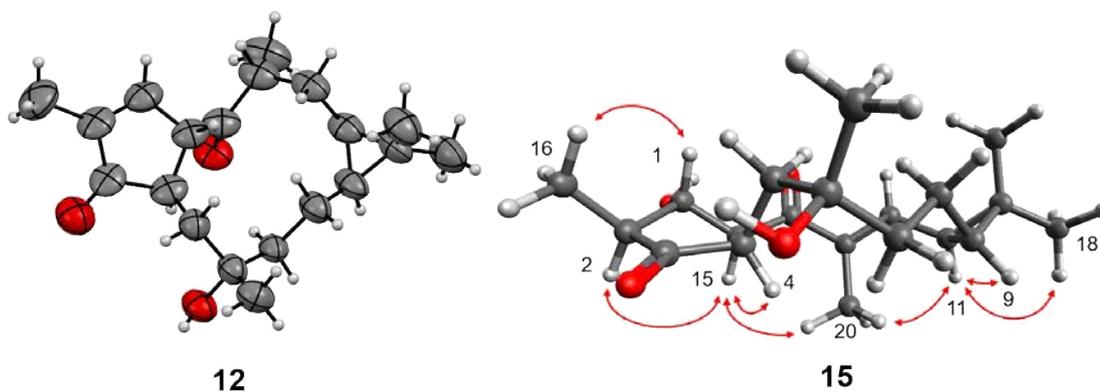


FIGURE 41 – Vue ORTEP du composé **12** obtenue par cristallographie et effets NOE clés du composé **15**

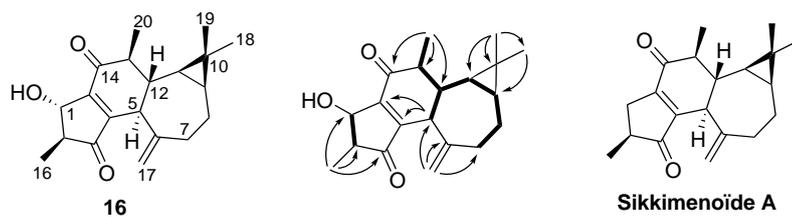


FIGURE 42 – Structures et corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé **16**.

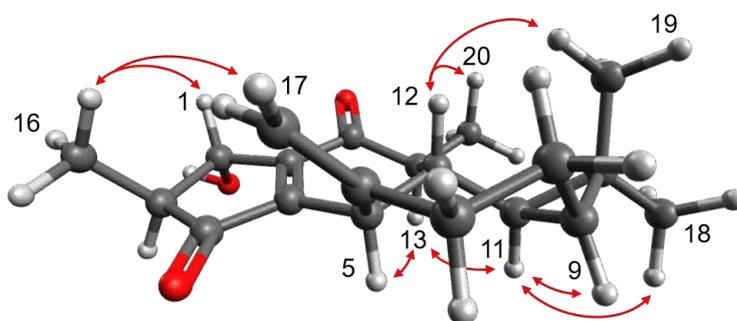


FIGURE 43 – Effets NOE clés du composé **16**.

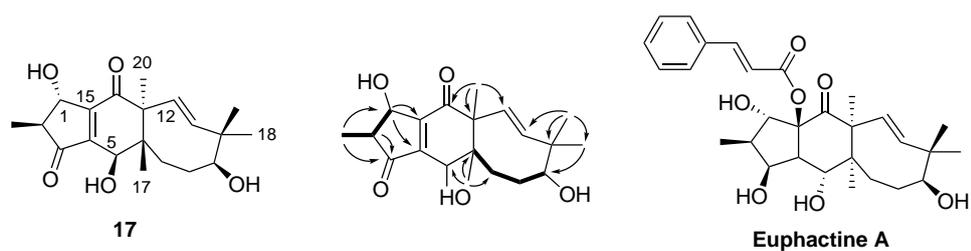


FIGURE 44 – Structures et corrélations COSY (gras) et HMBC (noir) clés du composé **17**.

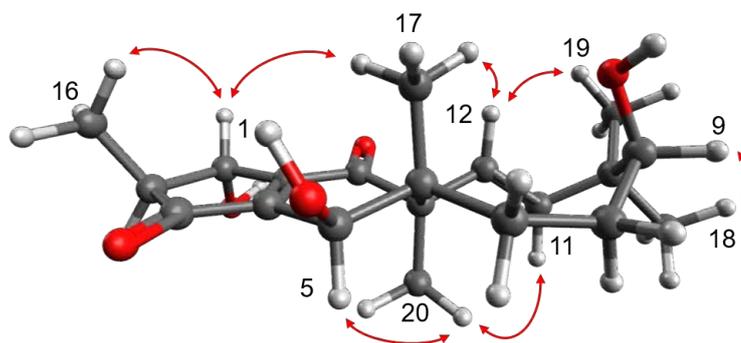


FIGURE 45 – Effets NOE clés du composé **17**.

concernant les euphactines (Figures 44 et 45, Tableaux VI et VII, Annexe B : Figure 66 et Annexe C : Figure 80).

Tableau VI – Données RMN ^1H des composés **12** à **17** (500MHz CDCl_3)

no,	16	17
1	4,86, d (2,5)	4,85, d (2,5)
2	2,45, m	2,57, qd (7,5, 2,5)
5	3,24 dl (9,0)	4,58, sl
7 α	2,54, dd (12,5, 5,5)	2,08, dd (15,8, 11,3)
7 β	2,26, dd (13,0, 12,5)	1,19, dd (15,8, 7,0)
8 α	2,21, m	1,49, m
8 β	0,93, m	1,43, m
9	0,88, m	3,34, dd (10,5, 2,5)
11	0,56, dd (9,8, 9,2)	5,48, d (17,0)
12 α	1,41, dd (19,2, 12,5)	5,83, d (17,0)
13	2,44 m	-
16	1,28, d (7,8)	1,33, d (7,5)
17	4,71, d (9,0) 4,04, d (14,4)	0,93, s
18	1,11, s	1,26, s
19	0,92, s	1,05, s
20	1,15, d (6,7)	1,30, s

Tableau VII – Données RMN ^{13}C des composés **1** à **17** (125 MHz, MeOD (**4**), CDCl_3)

no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	115,4	115,1	37,3	67,4	31,8	34,6	72,8	73,4	66,9	34,4	73,2	152,1	75,9	77,9	78,3	74,2	73,7
2	199,4	199,4	34,6	48,2	41,7	41,9	51,1	51,3	46,5	42,3	45,1	141,3	48,9	50,7	51,1	50,3	51,4
3	80,6	80,6	216,8	210,9	214,1	83,1	209,5	210,4	212,2	83,7	204,8	210,6	205,8	204,8	216,7	207,5	207,8
4	43,0	43,0	47,6	158,2	158,0	159,4	156,3	155,7	155,6	160,8	156,7	41,6	139,1	162,1	54,1	153,4	156,3
5	47,9	48,0	50,2	70,8	70,9	71,8	70,6	71,0	70,8	72,3	70,8	41,7	60,1	50,2	31,1	45,8	70,5
6	23,1	23,1	20,2	51,9	50,7	51,2	50,9	48,4	48,2	48,8	47,8	71,9	62,8	61,1	73,0	153,6	59,4
7	30,1	30,1	29,8	34	32,9	33,3	32,7	30,4	30,7	30,8	30,6	39,8	36,3	40,6	38,5	40,2	28,0
8	135	135,8	126,6	20,3	19,6	19,7	19,4	28,2	21,3	21,6	21,3	18,7	18,3	19,6	21,4	27,2	29,9
9	123,7	123,4	157,5	28,2	27,1	26,9	26,9	37,2	37,3	37,1	37,1	26,7	36,6	28,5	30,9	26,4	84,6
10	148,1	148,8	38,2	21,0	20,2	20,1	20,1	44,1	44,2	44,1	44,2	16,1	26,8	18,3	22,3	19,7	44,7
11	107,7	107,1	131,2	31,1	30,2	30,3	29,7	73,6	73,8	73,7	73,7	19,2	28,7	23,4	25,1	35,5	141,6
12	152,1	145,7	160,1	71	69,6	70,2	70	45,2	45,4	45,4	45,1	27,5	146,7	26,7	131,5	47,3	125,0
13	157,2	157,6	109,5	61	59,9	58,2	59,9	54,5	54,6	53,3	54,9	44,2	137,3	44,2	144,0	49,4	53,3
14	111,3	114,8	114,3	210,1	209,3	209,1	209,5	205,8	205,4	204,5	205,2	209,1	195,2	210,9	208,0	202,3	202,8
15			173,1	149,8	146,0	135,4	146,0	147,8	148,4	134,7	145,1	60,5	159,2	137,6	54,6	157,7	147,5
16				9,1	16,2	17,9	13	12,9	10,0	17,9	12,2	10,4	14,2	14,4	12,1	14,3	12,9
17				14,7	14,4	14,2	14,2	14,4	14,4	14,4	15,6	28,5	16,3	18,6	32,2	110,5	0,93
18	25,0	24,9	26,8	29,1	28,9	28,9	28,7	28,4	28,4	28,5	28,4	28,8	28,3	28,9	28,6	28,6	1,26
19	13,4	13,4	21,3	15,4	15,4	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	15,0	15,7	15,2	15,3	17,0	1,05
20			24,5	12,0	12,2	13	12,0	14,1	14,1	14,8	14,3	13,4	11,8	17,8	13,0	11,2	1,30
5-OAc																	170,9 20,8
12-OMe	56,2	56,2															
13-OMe	56,2																

2.3 Activités biologiques des diterpènes isolés

S. guyanensis a été sélectionnée pour ses propriétés inhibitrices du CHIKV, mais l'évaluation de l'activité biologique des produits purs a démontré que seul le composé **13** inhibaient de façon modérée le CHIKV ($EC_{50} = 14 \mu\text{M}$, $SI = 1.92$). Ces résultats peuvent être expliqués par de possibles effets synergiques entre certains composés ou par la présence de composés très actifs en concentration très faible. Une étude approfondie des données de spectrométrie de masse en tandem s'appuyant sur l'emploi des réseaux moléculaires, a permis de montrer que des analogues du TPA (voir 3.2.1, IC_{50} Anti-CHIKV = 2,9 nM) pourraient être présents dans l'extrait de *S. guyanensis*. Toutefois, la faible concentration de ces métabolites rend très difficile leur isolement et leur caractérisation par RMN.

Les réseaux moléculaires La structure des molécules dicte la manière dont elles se fragmentent en MS^2 . Par conséquent, des molécules similaires possèdent des spectres de fragmentation semblables. Les réseaux moléculaires permettent de visualiser tous les ions détectés et fragmentés durant une analyse MS^2 et leur degré de similarité.⁸⁷ Chaque composé ayant fragmenté en MS^2 est représenté par un cercle. Les cercles sont reliés entre eux par des liens dont l'épaisseur est fonction de la similarité des spectres MS^2 . L'observation de clusters ou groupes d'ions reliés signifie que les espèces chimiques qu'il contiennent possèdent des voies de fragmentation similaires en MS^2 et donc probablement des structures chimiques similaires. Grâce à des standards dont on connaît la structure, il a été possible d'annoter ces familles moléculaires. La comparaison de ces spectres avec des bases de données en ligne a permis de trouver des analogues potentiels des molécules analysées (Figure 46).

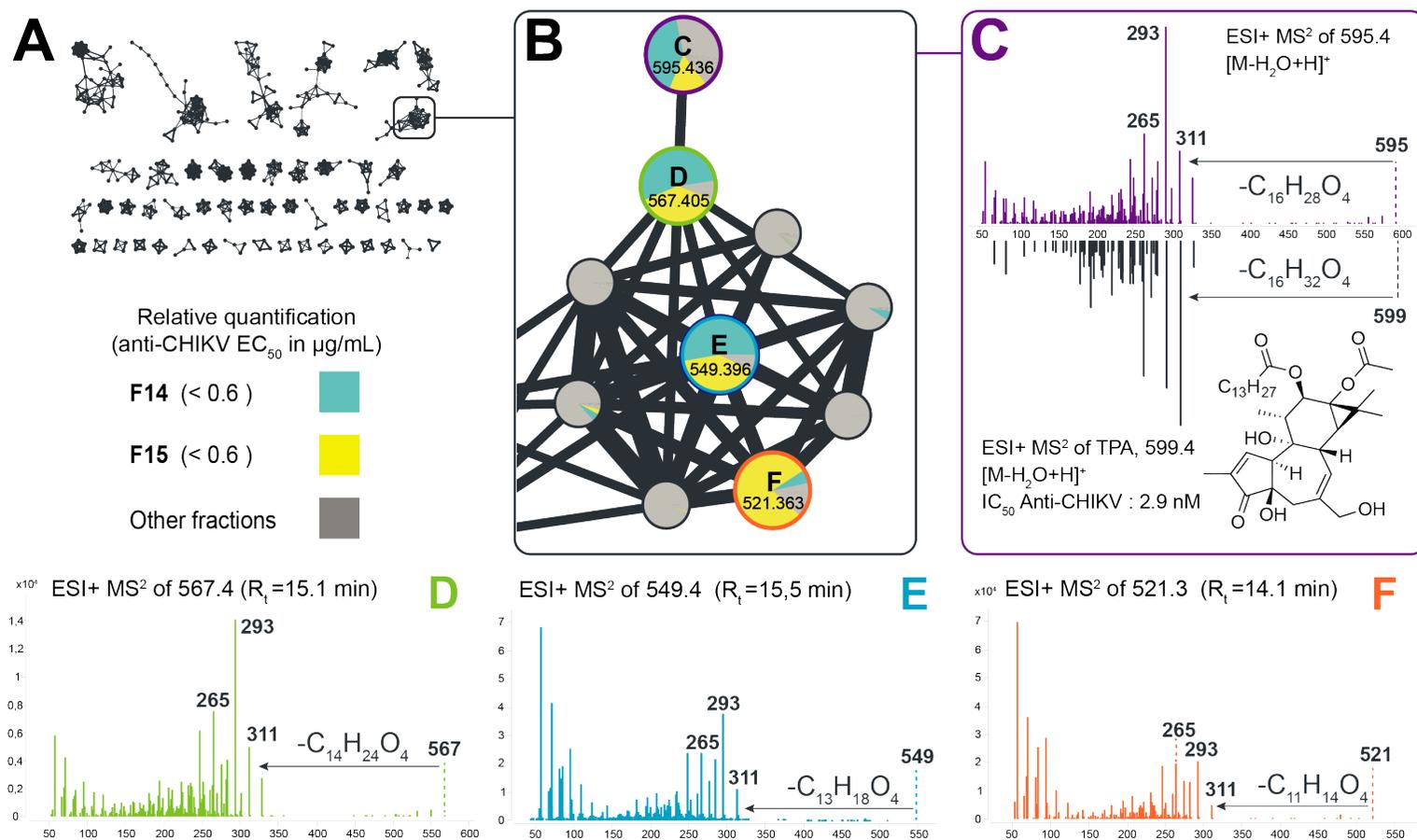


FIGURE 46 – (A) Réseau moléculaire des fractions (F3-F16) de l'écorce de *S. guyanensis*. (B) Clusters d'analogues du phorbol. La représentation de la quantification relative de chaque ion dans les fractions est basée sur l'aire des pics de LC-MS. (C) Spectres MS² annotés comme analogues du TPA lors de la comparaison aux bases de données du GNPS. (D,E et F) Spectres MS² des nodes D,E et F provenant du cluster (B) montrant des fragments caractéristiques des phorbols et des pertes de neutres correspondant à différents acides gras.

Chapitre 3

Hypothèses biosynthétiques

3.1 Les phénanthrènes

Dans la littérature, le squelette phénanthrène portant un gem diméthyl, caractéristique des composés **1** à **3**, est rarement représenté. Alors que les phénanthrènes dérivent généralement de la cyclisation d'une chaîne polyacétique, l'originalité des phénanthrénoides présentés en section 2.2.1, réside dans leur origine terpénique. En effet, la présence d'un groupement méthyle en position 20 et d'un groupement gem-diméthyl en position 4 suggère un précurseur diterpénique. Ils sont considérés comme des « diterpènes polycycliques dégradés ». Contrairement aux diterpènes macrocycliques, la cyclisation du précurseur tétraprényle fait intervenir une cyclase de type 2 (Figure 7). Les phénanthrènes isolés pourraient dériver d'un squelette *ent*-déhydroabiétane venant lui-même d'un (-)-copalyl PP issu de la cyclisation d'un précurseur GGPP par l'action d'une cyclase de type 2.⁸ Après plusieurs étapes d'oxydation, ce *ent*-déhydroabiétane pourrait avoir perdu dans un premier temps les carbones 16 et 17 pour donner des 16,17-dinor-diterpènes tels que le composé **3** puis le carbone 20 pour donner des 15,16,17,20-tetranor-diterpènes tels que les composés **1** et **2**. (Figure 47).

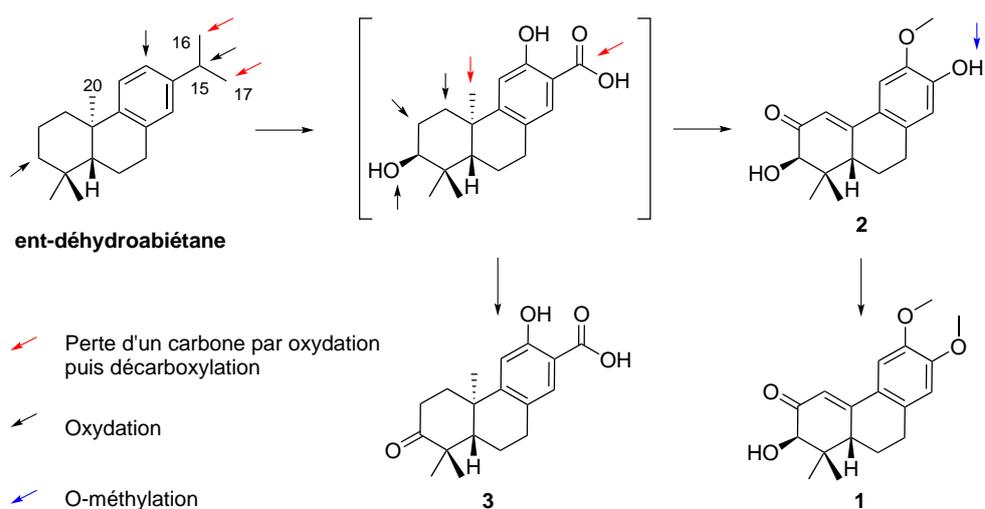
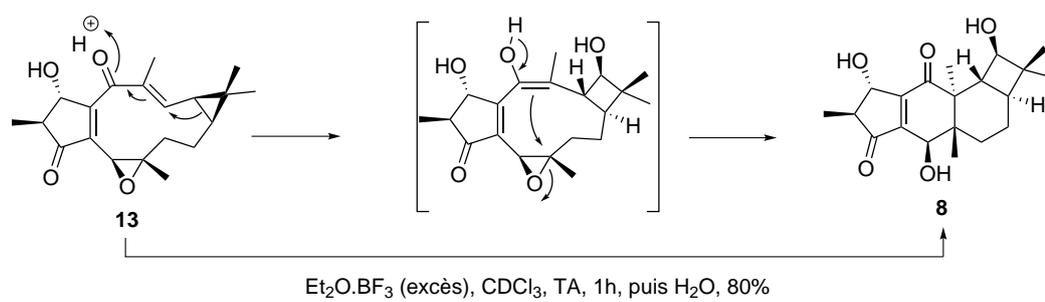


FIGURE 47 – Hypothèses biosynthétiques des diterpènes dégradés isolés de *S. guyanensis*

3.2 Les euphoractanes

Enfin, sur le plan biosynthétique, le squelette euphoractane pourrait dériver d'un squelette lathyrane par une cyclisation transannulaire précédemment décrite par Appendino.³⁸ Deux arguments appuient cette hypothèse. D'une part, le co-isolément de lathyranes epoxydés dont la fonctionnalisation permettrait la cyclisation chez *S. guyanensis*, et d'autre part, la conversion du lathyrane **13** en composé **8** en présence d'un acide de Lewis tel que le trifluoroacétate de bore. En effet, au bout d'une heure à température ambiante, traitement par l'eau et séchage, l'intégration des signaux de ¹H RMN du milieu réactionnel montre que le lathyrane **13** a donné le composé **8** possédant un squelette dérivé de l'euphoractine A avec un rendement d'environ 80%.

FIGURE 48 – Hypothèse biosynthétique des euphoractanes isolés de *S. guyanensis*

Troisième partie

Discussion et conclusion

Discussion

Les DM, un avantage sélectif

Malgré le manque d'informations sur le rôle écologique ou biologique des euphoractanes et des diterpènes dégradés au sein des Euphorbiaceae, il est aujourd'hui admis que les métabolites spécialisés tels que les DM représentent des adaptations à des situations écologiques spécifiques (prédateurs, climat, terrain...).⁸⁸

La théorie de l'évolution nous apprend qu'au sein d'une population donnée, certains individus subissent des mutations conduisant à la production de nouvelles enzymes capables de synthétiser de nouvelles molécules. Un tel mutant persistera dans la population uniquement si le coût de fabrication du nouveau composé est compensé par ses bénéfices pour l'individu.⁸⁹ Si l'on considère que ce sont les propriétés intrinsèques de la molécule (non de l'enzyme) qui font l'objet de la sélection, le nouveau composé peut :

1. Posséder des propriétés nouvelles qui contribuent à l'**amélioration** du fonctionnement de l'organisme.
2. Posséder des propriétés nouvelles qui peuvent engendrer une **dégradation** du fonctionnement de l'organisme.
3. Posséder des propriétés nouvelles mais qui n'ont **pas d'impact** sur le fonctionnement de l'organisme à l'exception de son coût de production.
4. Posséder des propriétés nouvelles qui **se substituent** à une propriété essentielle existante **sans avoir d'impact** sur le fonctionnement de l'individu à

l'exception du coût de production et de la redondance fonctionnelle.

5. Posséder des propriétés nouvelles qui **se substituent** à une propriété essentielle existante avec un **impact négatif** sur le fonctionnement de l'individu.

Dans le premier cas, la pression de sélection favorisera la rétention des individus possédant le nouveau caractère au sein de la population. Dans les autres cas, les individus disparaîtront de la population à un rythme dépendant du **ratio coût / bénéfice**. Une plante a donc peut de chance de produire des métabolites "inutiles". Or, les molécules décrites dans ce manuscrit sont les composés majoritaires des extraits étudiés. Deux propositions sont donc envisageables :

- La plante a acquis ces caractéristiques relativement tard au cours de l'évolution, elles ne sont pas bénéfiques pour la plante et ne seront peut être pas conservées par la suite. Cette hypothèse est peut probable car plusieurs espèces possèdent ces caractères.
- L'évolution a conservé ces métabolites, par conséquent, même si des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser leur rôle, ils procurent très probablement un avantage sélectif à la plante.

La convergence évolutive

Les composés **4** à **15** sont nouveaux, mais leurs squelettes carbonés ont déjà été rapportés dans la littérature. En effet, au début des années 1990 et plus récemment, l'équipe de Jian-Gong a mis en évidence l'existence d'une famille de diterpènes originaux au sein d'*Euphorbia micractina* : les euphoractines possédant un squelette de type euphoractane (cf composé **4** à **11**) qui est constitué soit d'un tétracycle 5/6/6/4 soit d'un cycle 5/6/7/3, ce dernier ayant été validé *a posteriori* consécutivement à la révision de l'euphoractine B.^{80,83} Les euphoractines constituent donc une famille regroupant deux squelettes tétracycliques différents. La distribution des euphoractines au sein des Euphorbiaceae est intéressante car elles n'ont été retrouvées que



FIGURE 49 – Carte politique de la pangée⁹⁰

chez deux espèces assez différentes. En effet, d'un point de vue **taxonomique**, elles appartiennent à deux tribus (*i.e.* Crotonoideae et Euphorbioideae respectivement) qui se sont séparées tôt dans l'histoire de l'évolution. D'un point de vue **géographique**, les deux plantes proviennent de territoires distants sans lien biogéographique; *S.guyanensis* est endémique de Guyane tandis que *E. micractina* provient de Chine. Ces deux pays s'étendent sur des territoires qui n'ont jamais été en contact lors de la formation des continents.

La présence simultanée de composés similaires dans deux familles de plantes sur deux continents différents peut être causée par un phénomène de convergence évolutive ou par une régulation variable des gènes.⁹¹ Même si les gènes impliqués dans la synthèse des métabolites ne sont pas structurellement "perdus" au cours de l'évolution, leur expression peut cesser du fait de modifications génétiques ou épigénétiques. Dans certains cas, ces gènes "éteints" peuvent être "rallumés" plus tard menant à

un saut dans l'évolution moléculaire.⁹² La convergence évolutive est divisée en deux catégories. La première correspond aux cas où différents taxons acquièrent la capacité de synthétiser des composés remplissant une fonction similaire. La deuxième catégorie correspond aux cas où des taxons différents deviennent capables de synthétiser des composés similaires.⁹³ C'est le cas de la production des euphoractanes chez *S. guyanensis* et *E. micractina*.⁹¹

Il est impossible de vérifier l'hypothèse de convergence évolutive sur l'unique base des études phytochimiques. L'absence de preuve n'étant pas une preuve d'absence, lorsqu'un métabolite est retrouvé dans des taxons éloignés alors qu'il semble absent dans des taxons proches, le problème majeur est de vérifier l'absence du métabolite considéré. La quantité de ce composé peut être soit sous le seuil de détection, soit présent dans une autre partie de plante, à un autre stade de développement ou produit durant une période / localisation donnée ou en réponse à un événement écologique... La seule preuve directe d'une convergence évolutive est la présence de gènes ou d'enzymes non-orthologues impliqués dans la synthèse d'un même composé dans différents taxons.⁹³

Les composés **1** à **3** sont considérés comme des diterpènes dégradés (Section 3.1). Les premières molécules de ce type, les micrandrols, ont été découvertes chez *Micrandropsis scleroxylon* et *Sagotia racemosa*.^{94,95} Puis, l'étude de *Domohinea perrieri* a permis d'isoler la domohinone.⁷⁹ Enfin, l'étude de *Trigonostemon xyphophylloides* a conduit à l'isolement de la trigoxyphin G.⁹⁶ Contrairement aux euphoractanes, ces diterpènes atypiques sont retrouvés dans un groupe taxonomique restreint au sein des Crotonoideae, ce qui peut indiquer l'acquisition d'une machinerie enzymatique spécifique au sein de ce groupe.

Le métabolisme spéculatif, source de diversité chimique

La diversité chimique de DM de *S.guyanensis* et plus généralement des DM d'Euphorbiaceae est remarquable. La question de la source d'une telle diversité et de son utilité pour la plante reste cependant à ce jour inexplicée.

Lorsque les propriétés des molécules sont prises en considération plutôt que leurs structures chimiques, on peut prédire que chaque organisme privilégie la production de ces molécules dès lors que leurs propriétés sont adaptées à son fonctionnement ; ce sont en effet les propriétés qui sont essentielles à la survie de la plante. L'évolution peut donc engendrer de la diversité chimique au sein d'une catégorie fonctionnelle de manière à ce que des molécules différentes puissent jouer des rôles similaires dans des organismes différents car elles possèdent des propriétés similaires (*e.g.* chitine vs cellulose, amidon vs inuline). De la même manière, des composés chimiques similaires peuvent jouer des rôles différents dans des organismes car ils peuvent posséder plusieurs propriétés (*e.g.* les flavonoides agissant comme écran UV, molécules de communication et de défense).

Si l'on admet que les propriétés déterminent la "valeur" des molécules, et que la mise en place d'une voie métabolique peut conduire à l'apparition de propriétés distinctes, alors la classification du métabolisme en métabolismes primaire et secondaire (qui est généralement la seule classification admise) est remise en cause. En effet, cette classification réduit les substances naturelles en deux catégories : la première correspondant aux molécules indispensables à la pérennité des êtres vivants, et la seconde qui regrouperait des métabolites produits uniquement par certains organismes et dont la production n'est pas essentielle à leur survie.⁹⁷ Or, certaines substances naturelles peuvent entrer dans l'une ou l'autre de ces catégories lorsqu'on considère indépendamment leur fonction ou leur structure (*e.g.* gibberellins, caroténoïdes, lipides...). Des familles de composés vitales pour les plantes sont ainsi considérées

comme des métabolites secondaires ; les lipides, composant essentiels des membranes cellulaires devraient être classés comme métabolites primaire. Cependant, la diversité chimique de certains lipides varient énormément en fonction des espèces. Par conséquent certains lipides devraient être considérés comme des métabolites secondaires tandis que d'autres appartiendraient au métabolisme primaire.⁹⁸ Pour pallier aux lacunes de la classification de Kössel, Firm et Jones proposent une classification en trois catégories :⁸⁹

Le métabolisme basal intégré correspondant aux voies métaboliques intégrées très tôt dans l'évolution et qui sont nécessaires à l'ensemble réseau métabolique s'apparenterait donc au métabolisme primaire.

Le métabolisme de support qui génère des substances indispensables à l'environnement physique du métabolisme basal intégré (e.g. les lipides).

Le métabolisme spéculatif regroupant les voies métaboliques produisant à faible coût des composés rares aux propriétés parfois éphémères. Pour ces métabolites, la pression de sélection est différente de celle appliquée aux deux autres catégories. Par exemple, l'apparition d'une nouvelle maladie, placera une grande pression de sélection sur les voies métaboliques menant à des composés bio-actifs spécifiques menant éventuellement à la capacité de résister à cette maladie. Au contraire, si certains types de propriétés physico-chimiques sont utiles à la cellules mais ne sont pas hautement structure-spécifiques, alors une diversité de composés peut être retrouvée dans une seule espèce. La pression de sélection n'est tout simplement pas suffisante pour limiter la diversification.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'illustrer la diversité des produits naturels d'origine terpénique. L'étude de la littérature a permis de rappeler le potentiel thérapeutique des DM et l'état des connaissances actuelles concernant leurs origines a mis en évidence un manque d'information sur les voies de biosynthèse qui tend à se combler grâce aux avancées technologiques en bioingénierie.

L'activité inhibitrice du CHIKV présentée par l'extrait d'écorce de *Sandwithia guyanensis* a motivé le choix de cette plante pour son étude phytochimique. Dans un premier temps, l'étude de cette Euphorbiaceae méconnue, a permis d'isoler et de caractériser 19 composés dont 2 connus. Ces composés dont certains sont très rares peuvent être classés en 6 grandes familles de diterpènes : les phénantrénoïdes, les euphoractines A et B, les lathyranes, les jatrophanes et les euphactines. Dans un second temps, le potentiel d'inhibition de ces composés vis-à-vis du CHIKV a été évalué. A l'exception du composé **13** ($EC_{50} = 14 \mu\text{M}$, $SI = 1.92$) aucun composé n'a démontré d'effet inhibiteur du CHIKV. Grâce à l'analyse des données de LC-MS² par les réseaux moléculaires, il a été possible de montrer que l'activité de l'extrait pourrait être expliquée par des concentrations résiduelles d'analogues du TPA ($IC_{50} \text{ Anti-CHIKV} = 2,9 \text{ nM}$), un puissant inhibiteur du CHIKV. Enfin, des hypothèses biosynthétiques ont été proposées concernant l'origine des euphoractanes et des phénanthrénoïdes, celles-ci pourraient être vérifiées par des expériences de marquages isotopiques.

Les DM isolés procurent un avantage évolutif aux plantes qui les produisent.

Des études métabolomiques comparant leur production en fonction de paramètres biotiques (infection par un champignon, infestation par des insectes ravageurs) et abiotiques (saisons, sécheresse, type de terrain) pourraient être menées afin d'apporter des éléments sur leur(s) rôle(s) biologique(s).

Bibliographie

1. LI, J. W. ; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products : end of an era or an endless frontier ? *Science* **2009**, *325*, 161–5.
2. GROUP, T. A. P. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, *161*, 105–121.
3. PRENNER, G. ; RUDALL, P. J. Comparative ontogeny of the cyathium in Euphorbia (Euphorbiaceae) and its allies : exploring the organ-flower-inflorescence boundary. *American journal of botany* **2007**, *94*, 1612–1629.
4. [http ://euphorbiaceae.org/pages/about-euphorbia.html](http://euphorbiaceae.org/pages/about-euphorbia.html).
5. MAHLBERG, P. G. et al. Laticifers and the classification of Euphorbia : the chemotaxonomy of Euphorbia esula L. *Botanical Journal of the Linnean Society* **1987**, *94*, 165–180.
6. PINTUS, F. et al. *Euphorbia* latex biochemistry : Complex interactions in a complex environment. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **2010**, *144*, 381–391.
7. OSBOURN, A. E. ; LANZOTTI, V., *Plant-derived Natural Products*, 2009.
8. DEWICK, P. M., *Medicinal Natural Products*, 2009.
9. VASAS, A. ; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes : isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). *Chem Rev* **2014**, *114*, 8579–612.
10. ADOLF, W. et al. Euphorbiasteroid (Epoxy-lathyrol) A new tricyclic diterpene from Euphorbia lathyris. *Tetrahedron Letters* **1970**, *11*, 2241–2244.
11. ZERBE, P. et al. Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. *Plant Physiol* **2013**, *162*, 1073–91.

12. In *Comprehensive Natural Products II : Chemistry and Biology*, LIU, L. M. H.-W., éd. ; Elsevier Science : 2010 ; chap. 12, p. 502–508.
13. FRANK, A. ; GROLL, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem Rev* **2016**, 5675–5703.
14. ARENDT, P. et al. Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. *Plant J* **2016**, 87, 16–37.
15. CASTELBLANQUE, L. et al. Novel Insights into the Organization of Laticifer Cells : A Cell Comprising a Unified Whole System. *Plant Physiol* **2016**, 172, 1032–1044.
16. WISE, R. R. ; HOOBER, J. K., *The Structure and Function of Plastids*, 2006 ; t. 23.
17. KINGHORN, A. D. et al., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 2016 ; t. 102.
18. WEINHEIMER, A. J. ; CHANG, C. W. J. ; MATSON, J. A. in *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, HERZ, W., GRISEBACH, H., KIRBY, G. W., édés. ; Springer Vienna : Vienna, 1979, p. 285–387.
19. ADOLF, W. ; HECKER, E. Diterpenoid Irritants and Cocarcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae : Structural Relationships in View of their Biogenesis. *Israel Journal of Chemistry* **1977**, 16, 75–83.
20. ROBINSON D. R. ; WEST, C. A. Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *Ricinus communis*. I. Identification of diterpene hydrocarbons formed from mevalonate. *Biochemistry* **1970**, 9, 70–79.
21. <http://www.maxisciences.com/plante/>.
22. DUEBER, M. T. ; ADOLF, W. ; WEST, C. A. Biosynthesis of the Diterpene Phytoalexin Casbene : Partial Purification and Characterization of Casbene Synthetase from *Ricinis communis*. *Plant Physiology* **1978**, 62, 598–603.
23. NAKANO, Y. et al. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnology* **2012**, 29, 185–189.
24. KIRBY, J. et al. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* **2010**, 71, 1466–73.
25. KING, A. J. et al. A Cytochrome P450-Mediated Intramolecular Carbon-Carbon Ring Closure in the Biosynthesis of Multidrug-Resistance-Reversing Lathyrane Diterpenoids. *Chem-biochem* **2016**, 17, 1593–7.

26. LUO, D. et al. Oxidation and cyclization of casbene in the biosynthesis of Euphorbia factors from mature seeds of Euphorbia lathyris L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, E5082–9.
27. DUARTE, N. et al. Synergistic interaction between p-glycoprotein modulators and epirubicine on resistant cancer cells. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 9323–30.
28. CHAN, W. R. et al. Structure of crotofolin A, a diterpene with a new skeleton. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97*, 4437–4439.
29. CHAVEZ, K. et al. Crotofolane diterpenoids from Croton caracasanus. *Nat Prod Commun* **2013**, *8*, 1679–82.
30. KUPCHAN, S. M. et al. Structure and stereochemistry of jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor. *J Am Chem Soc* **1976**, *98*, 2295–2300.
31. LANZOTTI, V. Diterpenes for Therapeutic Use. **2013**, 3173–3191.
32. ALBERTO MARCO, J. et al. Jatrophone derivatives and a rearranged jatrophone from Euphorbia terracina. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1621–1630.
33. JAKUPOVIC, J. et al. Diterpenes from Euphorbia paralias. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1611–1619.
34. ZHOU, B. et al. Euphorbesulins A-P, Structurally Diverse Diterpenoids from Euphorbia esula. *J Nat Prod* **2016**, *79*, 1952–61.
35. BARILE, E.; LANZOTTI, V. Biogenetical related highly oxygenated macrocyclic diterpenes from sea spurge Euphorbia paralias. *Org Lett* **2007**, *9*, 3603–6.
36. JAKUPOVIC, J. et al. Diterpenes from Euphorbia segetalis. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1583–1600.
37. WAGNER, H.; HORHAMMER, L., *Pharmacognosy and Phytochemistry, 1st International Congress, Munich*, 1971.
38. APPENDINO, G. et al. Unnatural Natural Products from the Transannular Cyclization of Lathyrane Diterpenes. *Organic Letters* **2001**, *3*, 1609–1612.
39. WALLACH, O. Zur Kenntniss der Terpene und atherischen Oele. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1887**, *238*, 78–89.
40. GLEIZES, M. et al. Role of acyclic compounds in monoterpene biosynthesis in Pinus pinaster. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2641–2644.

41. JORGENSEN, L. et al. 14-Step Synthesis of (+)-Ingenol from (+)-3-Carene. *Science* **2013**, *341*, 878–882.
42. SCHMIDT, R. J. The biosynthesis of tiglane and related diterpenoids ; an intriguing problem. *Botanical Journal of the Linnean Society* **1987**, *94*, 221–230.
43. ERNST, M. et al. Global medicinal uses of Euphorbia L. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* **2015**, *176*, 90–101.
44. HECKER, E. Co-carcinogenic principles from the seed oil of Croton tiglium and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **1968**, *28*, 2338–2348.
45. ROSEN, R. H. ; GUPTA, A. K. ; TYRING, S. K. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses : rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. *J Am Acad Dermatol* **2012**, *66*, 486–93.
46. COLABUFO, N. A. et al. Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases : pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J Med Chem* **2010**, *53*, 1883–97.
47. WHITE, T. C. ; MARR, K. A. ; BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **1998**, *11*, 382–402.
48. LI, X. Z. ; NIKAIIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria : an update. *Drugs* **2009**, *69*, 1555–623.
49. <http://herbariovirtualbanyeres.blogspot.fr/2013/03/euphorbia-lagascae-lechetrezna.html>.
50. ZHU, J. et al. Jatrophone Diterpenoids as Modulators of P-Glycoprotein-Dependent Multidrug Resistance (MDR) : Advances of Structure-Activity Relationships and Discovery of Promising MDR Reversal Agents. *J Med Chem* **2016**, *59*, 6353–69.
51. DEWANJEE, S. et al. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules* **2017**, *22*, 871.
52. JIAO, W. et al. Lathyrane diterpenes from Euphorbia lathyris as modulators of multidrug resistance and their crystal structures. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 4786–92.
53. ESPOSITO, M. et al. Evaluation of Jatrophone Esters from Euphorbia spp. as Modulators of Candida albicans Multidrug Transporters. *J Nat Prod* **2017**, *80*, 479–487.
54. RAWAL, M. K. et al. Jatrophanes from Euphorbia squamosa as potent inhibitors of Candida albicans multidrug transporters. *J Nat Prod* **2014**, *77*, 2700–6.

55. DAS, J. ; RAHMAN, G. M. C1 domains : structure and ligand-binding properties. *Chem Rev* **2014**, *114*, 12108–31.
56. HARADA, S. et al. Tumor promoter, TPA, enhances replication of HTLV-III/LAV. *Virology* **1986**, *154*, 249–258.
57. HOSSAIN CHOWDHURY, M. I. et al. The phorbol ester TPA strongly inhibits HIV-1-induced syncytia formation but enhances virus production : Possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology* **1990**, *176*, 126–132.
58. JIANG, G. ; DANDEKAR, S. Targeting NF-kappaB signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2015**, *31*, 4–12.
59. WARRILOW, D. et al. HIV type 1 inhibition by protein kinase C modulatory compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2006**, *22*, 854–64.
60. CASHMORE, A. R. et al. The structure of prostratin : a toxic tetracyclic diterpene ester from *Pimelea Prostrata*. *Tetrahedron Letters* **1976**, *17*, 1737–1738.
61. SANCHEZ-DUFFHUES, G. et al. Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists. A novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs. *Curr Drug Targets* **2011**, *12*, 348–56.
62. WENDER, P. A. ; KEE, J. M. ; WARRINGTON, J. M. Practical synthesis of prostratin, DPP, and their analogs, adjuvant leads against latent HIV. *Science* **2008**, *320*, 649–52.
63. BOURJOT, M. et al. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of Chikungunya virus replication. *J Nat Prod* **2012**, *75*, 2183–7.
64. BEDOYA, L. M. et al. SJ23B, a jatrophone diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV in vitro. *Biochem Pharmacol* **2009**, *77*, 965–78.
65. NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. et al. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J Nat Prod* **2015**, *78*, 1277–83.
66. ALLARD, P. M. et al. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 160–8.
67. [http ://columbatives.com/wordpress/trees-and-shrubs-to-6-metres/](http://columbatives.com/wordpress/trees-and-shrubs-to-6-metres/).
68. HOHMANN, J. et al. Diterpenoids from *Euphorbia peplus*. *Planta medica* **2000**, *66*, 291–294.

69. CHALLACOMBE, J. M. et al. Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *The Journal of Immunology* **2006**, *177*, 8123–8132.
70. [https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Croton-\(genre\)](https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Croton-(genre)).
71. BOYLE, G. M. et al. Intra-lesional injection of the novel PKC activator EBC-46 rapidly ablates tumors in mouse models. *PLoS One* **2014**, *9*, e108887.
72. KISSIN, I.; SZALLASI, A. Therapeutic Targeting of TRPV1 by Resiniferatoxin, from Pre-clinical Studies to Clinical Trials. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 2159–2170.
73. TIAN, Y. et al. Lathyrane diterpenoids from the roots of *Euphorbia micractina* and their biological activities. *J Nat Prod* **2011**, *74*, 1221–9.
74. XU, J. et al. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia prolifera* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1205–9.
75. <http://www.botany.wisc.edu/berry/projects/crotonFB/Pages/Projectbackground.html>.
76. BRENNAN, J. P. M. Noel Yvri Sandwith, 1901-1965. *Taxon* **1966**, *15*, 245–255.
77. LANJOUW, J. Contributions to the Flora of Tropical America : XI. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)* **1932**, *1932*, 183.
78. JACOBS, H. et al. Applications of 2D-nmr Spectroscopy to Phytochemical Studies : Cyperenol and Cyperenoic Acid. *Journal of Natural Products* **1987**, *50*, 835–842.
79. LONG, L. et al. Novel bioactive phenanthrene derivatives from *Domohinea perrieri*. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15663–15670.
80. SHI, J.-G.; JIA, Z.-J.; YANG, L. Diterpenoids from *Euphorbia micractina*. *Phytochemistry* **1992**, *32*, 208–210.
81. DUARTE, N.; FERREIRA, M. J. Lagaspholones A and B : two new jatrophenol-type diterpenes from *Euphorbia lagascae*. *Org Lett* **2007**, *9*, 489–92.
82. NAENGCHOMNONG, W. et al. Isolation and structure determination of four novel diterpenes from *jatropha curcus*. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 2439–2442.
83. TIAN, Y. et al. Diterpenoids with diverse skeletons from the roots of *Euphorbia micractina*. *J Nat Prod* **2013**, *76*, 1039–46.

84. ZHU, J.-Y. et al. Natural thioredoxin reductase inhibitors from *Jatropha integerrima*. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 47235–47243.
85. YANG, D. S. et al. Jatropholane-type diterpenes from *Euphorbia sikkimensis*. *J Nat Prod* **2013**, *76*, 265–9.
86. SHI, J.-G.; JIA, Z.-J. Diterpenoids from *Euphorbia micractina*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1445–1447.
87. WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 828–37.
88. SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes : defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* **2014**, *5*, 129–151.
89. FIRN, R. D.; JONES, C. G. A Darwinian view of metabolism : molecular properties determine fitness. *J Exp Bot* **2009**, *60*, 719–26.
90. <http://capitan-mas-ideas.blogspot.fr/2012/08/pangea-politica.html>.
91. ARIMURA, G.-i.; MAFFEI, M., *Plant Specialized Metabolism*, 2016.
92. WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 3–19.
93. PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu Rev Plant Biol* **2011**, *62*, 549–66.
94. DE ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Methylphenanthrenes from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 844–845.
95. DE ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R. Methyl- and methylthio-phenanthrenes from *Micrandropsis scleroxylon*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1283–1288.
96. LIN, B. D. et al. Trigoxypins A-G : diterpenes from *Trigonostemon xyphophylloides*. *J Nat Prod* **2010**, *73*, 1301–5.
97. KOSSEL, A. Uber die Chemische Zusammensetzung der Zelle. *Archiv fur Physiologie* **1891**, 181–186.
98. FIRN, R., *Nature's Chemicals*, 2009.

Annexes

Annexe A

Procédures expérimentales

General experimental procedures. Optical rotations were measured at 25 °C on an Anton Paar MCP 300 polarimeter. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 UV-vis spectrophotometer. NMR spectra were recorded in MeOD or CDCl₃ on a Bruker 500 MHz instrument (Avance 500), and on a Bruker 300 MHz instrument (Avance 300). Chemical shifts (relative to TMS) are in ppm, and coupling constants are in Hz. Kromasil analytical and semi-preparative C₁₈ columns (250 × 4.6 mm and 250 × 10 mm i.d; 5 μm Thermo Electron) and a Nucleodur PFP analytical column (250 × 4.6 mm i.d; 5 μm Macherey-Nagel) were used for HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV-vis diode array detector (190-600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. All solvents were purchased from Carlo Erba (France), and analytical plates (Si gel 60 F254) were from Merck (France). The sulfuric molybdate was used as the staining reagent for TLC. The reagent is prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL). Prepacked GraceResolv silica cartridges were used for flash chromatography using a Teledyne Isco Combiflash Rf 200i. HRESIMS data were acquired using an Acquity Waters UPLC coupled to a Waters LCT Premier XE mass spectrometer. The UPLC system was equipped with a Waters Acquity PDA detector. Separation was achieved on a BEH C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a H₂O-MeCN + 0.1% formic acid gradient as follows : 95 :5 to 0 :100 in 5.5 min. The ionization was carried out using an electrospray ionization source in the positive mode (range 80-1500 m/z).

Plant material. Bark of *Sandwithia guyanensis* was collected in June 2010 in Saint-Elie (French Guyana) and authenticated by Dr. Christian Moretti (IRD of French Guyana). A voucher

specimen (GUY-0361) has been deposited at IRD of French Guyana.

Extraction and isolation. The dried bark (704.2 g) of *S. guyanensis* were extracted with EtOAc (3×500 mL) to yield a crude extract (2.2 g) after concentration in vacuo at 40 °C. This extract was dissolved in 250 mL of MeCN and subjected to a liquid/liquid partition with n-heptanes (3×250 mL) to afford 1.1 g of a MeCN-soluble fraction. This residue was subjected to silica gel column chromatography using a gradient of n-heptane-EtOAc-MeOH of increasing polarities (1 :0 to 0 :1 :0 to 0 :7 :3, 40 mL/min) to afford 19 fractions, F1-F19, according to their TLC profiles. Purification of fraction F3 (55.2 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) leading to five fraction (F3-1 to F3-6). F3-2 was further purified by analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN-H₂O (45 :55) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), leading to compound **5** (1.5 mg) and compound **3** (1.8 mg) (Rt 9.01 and 12.07 min respectively). F3-3 was further purified by analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN-H₂O (45 :55) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), leading to compound **jatrointelone C** (3.2 mg) (Rt 12.94 min). F3-5 was further purified by analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN-H₂O (70 :30) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), leading to compound **16** (0.5 mg) (Rt 6.39 min). F4 (36.1 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compound **1** (1.5 mg) (Rt 9.46 min) and **jatrointelone A** (1.7 mg) (Rt 11.5 min). F5 (54.2 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 40 :60, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compound **2** (23.7 mg) (Rt 11.5 min). F6 (36.1 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compounds **13** (9.6 mg) **14** (15.0 mg) and **12** (1.8 mg) (9.53, 12.76 and 17.13 min respectively). F10 (30.9 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 15 min, 4.7 mL/min) affording compound **4** (2.7 mg) (Rt 11.06 min). F11 (40.6 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compounds **7** (9.9 mg) and **15** (2.8 mg) (Rt 12.46 and 24.04 min respectively). F13 (96.4 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compounds **6** (21.0 mg). F14 (69.9 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 25 :75 to 45 :55, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compounds **9** (2.7 mg) **10** (7.0 mg) and **17** (1.5 mg) (Rt 12.18, 14.11 min and 7.49 min) and F14-1. F14-1 was purified by analytical HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN, MeOH (50 :50)-H₂O + 0.1% formic acid, 55 :65, 1.0 mL/min) affording compound **11** (2.5 mg) (Rt 8.52 min). F15 (45.1 mg) was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1%

formic acid, 25 :75, in 30 min, 4.7 mL/min) affording compound **8** (6.5 mg) (Rt 15.90 min).

X-ray crystallographic analysis. All crystallographic data were collected on a Rigaku diffractometer constituted by a MM007 HF copper rotating-anode generator, equipped with Osmic confocal optics, and a Rapid II curved image plate.

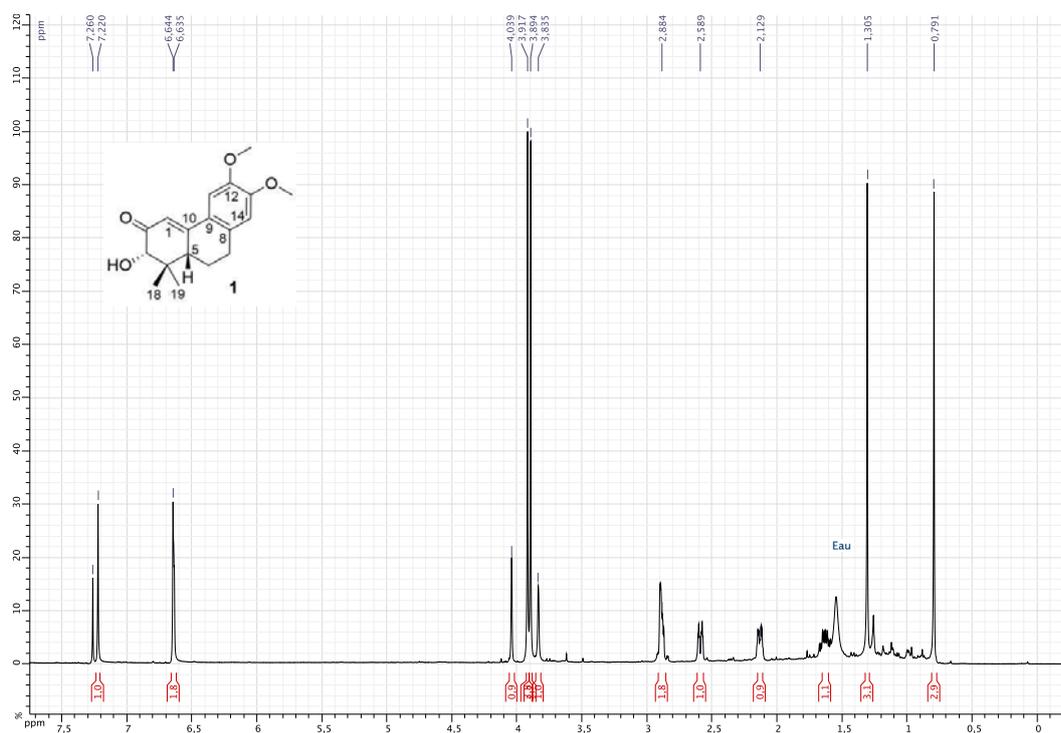
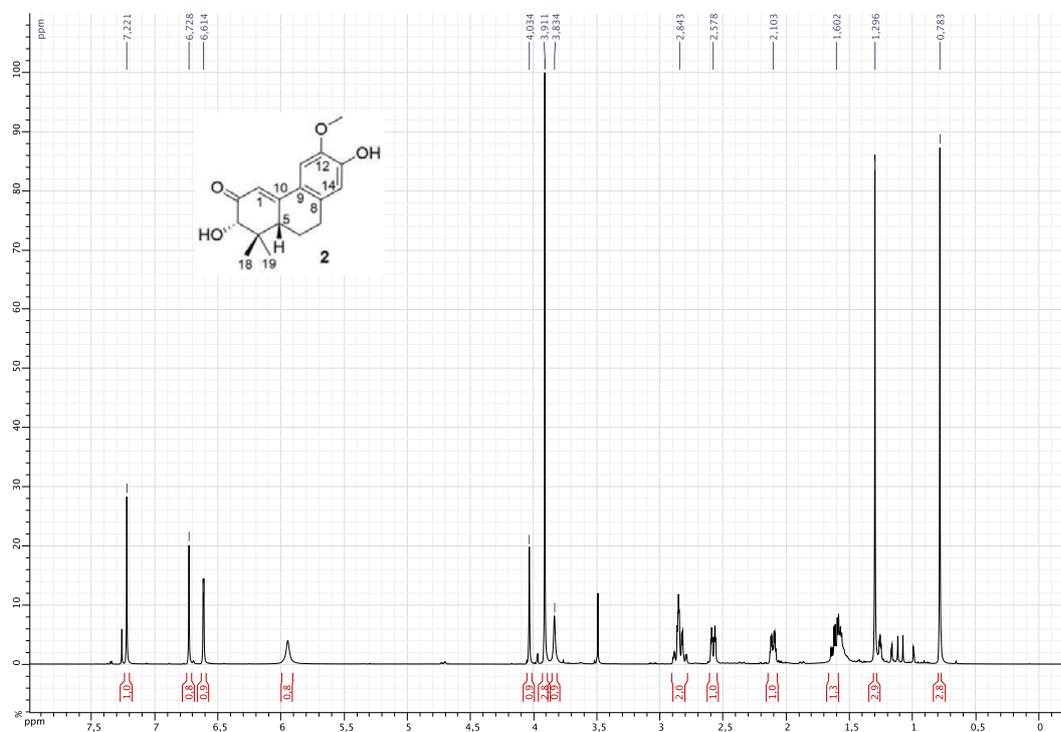
Conversion of compound 13 into compound 8 To a solution of **13** (1 mg) in CDCl₃ (400 µL) was added BF₃.OH₂ (10 eq., 4 µL). After 4h at room temperature, one drop of water was added and the mixture was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. ¹H NMR analysis was performed in CDCl₃ at 500 MHz.

Virus-Cell-Based Anti-alphavirus Assay The antiviral experiments have been performed in a biosafety screening facility that has been validated for handling chikungunya virus as well as the manipulation of molecules of unknown chemical safety risk. All studies have been performed by trained staff. Throughout the experiments, Vero (African green monkey kidney) cells were used. The following viruses were used : Chikungunya virus strain 899, Sindbis virus strain HRsp, and Semliki Forest virus strain Vietnam. Serial dilutions of the initial plant extracts, fractions, or compounds, as well as the reference compound, chloroquine, were prepared in assay medium (MEM Reg3 (cat. no. 19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% sodium bicarbonate) and were added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50 µL of a 4x virus dilution in assay medium was added, followed by 50 µL of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25 000 cells/50 µL, was prepared from a Vero cell line subcultured in cell growth medium (MEM Reg3 supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of sodium bicarbonate) at a ratio of 1 :4 and grown for 7 days in 150 cm² tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were returned to the incubator for 6 or 7 days (37 °C, 5% CO₂, 95-99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect was observed in untreated, infected controls. Subsequently, the assay medium was aspirated, replaced with 75 µL of a 5% MTS (Promega) solution in phenol red-free medium, and incubated for 1.5 h. Absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan); optical densities (OD values) reached 0.6-0.8 for the untreated, unin-

fected controls. Raw data were converted to percentages of controls, and the EC_{50} (50% effective concentration, or concentration that is calculated to inhibit virus-induced cell death by 50%) and CC_{50} (50% antimetabolic concentration, or concentration that is calculated to inhibit the overall cell metabolism by 50%) values were derived from the dose-response curves. All assay conditions producing an antiviral effect that exceeded 50% were checked microscopically for minor signs of a cytopathic effect or adverse effects on the host cell (i.e., altered cell morphology). A compound was considered to elicit a selective antiviral effect on virus replication only when, following microscopic quality control, at least at one concentration of compound no cytopathic or any adverse effect is observed (image resembling untreated, uninfected cells). Multiple, independent experiments were performed.

Annexe B

Spectres RMN ^1H

FIGURE 50 – Spectre ^1H du composé **1** (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 51 – Spectre ^1H du composé **2** (500 MHz, CDCl_3)

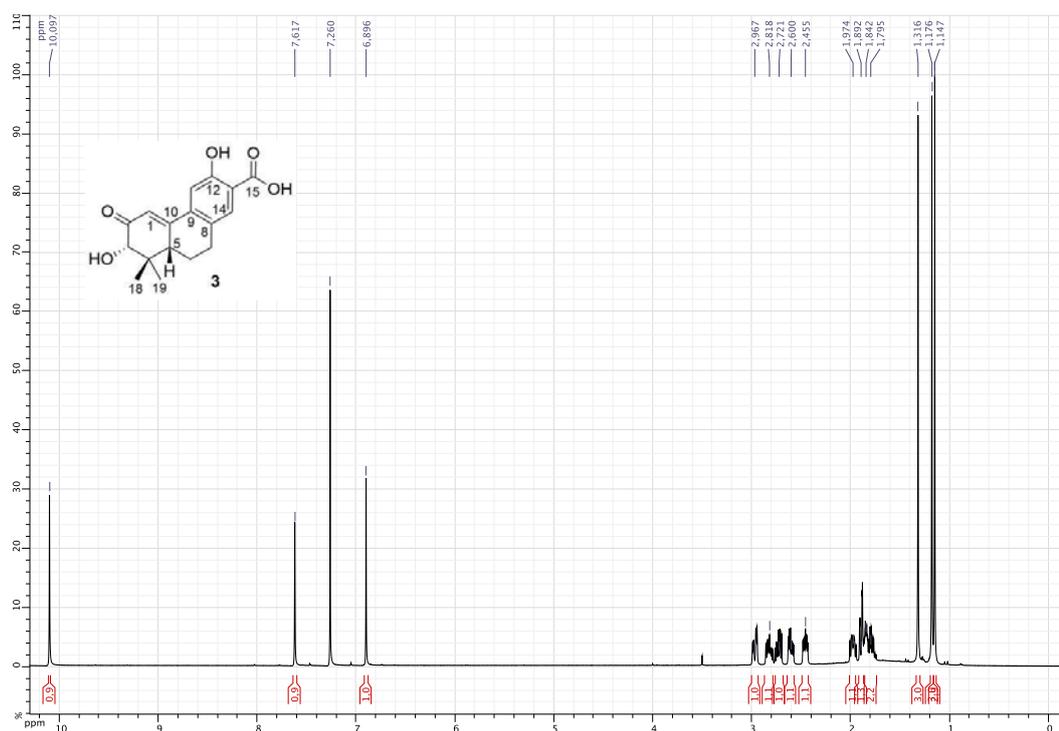


FIGURE 52 – Spectre ^1H du composé **3** (500 MHz, CDCl_3)

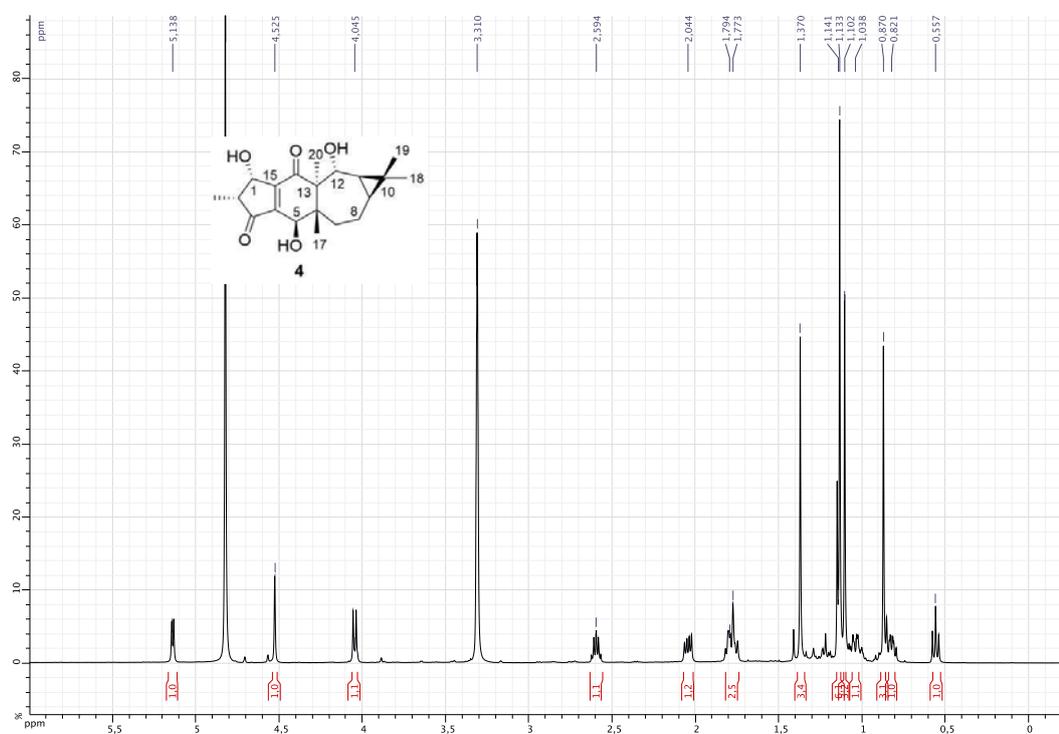
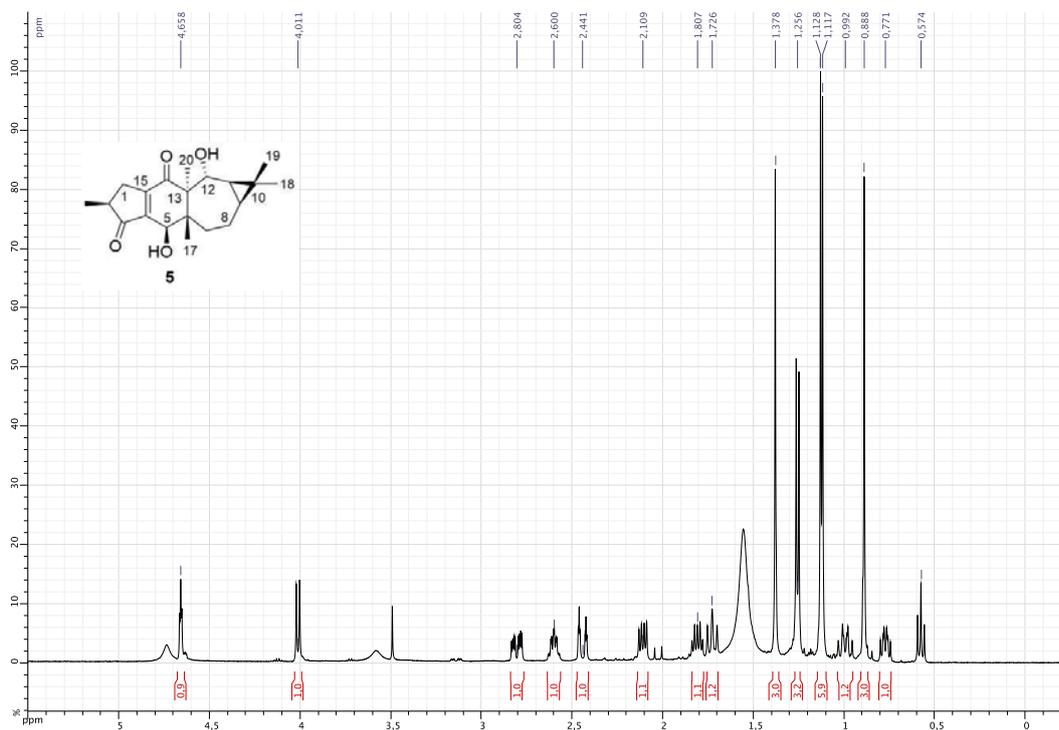
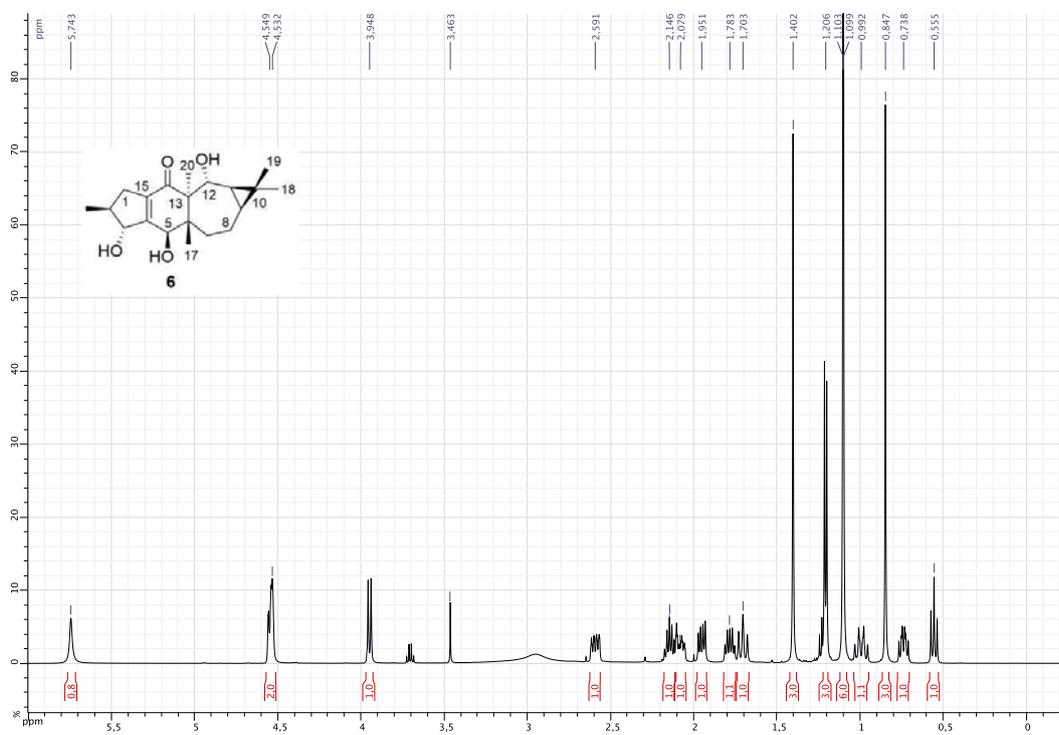
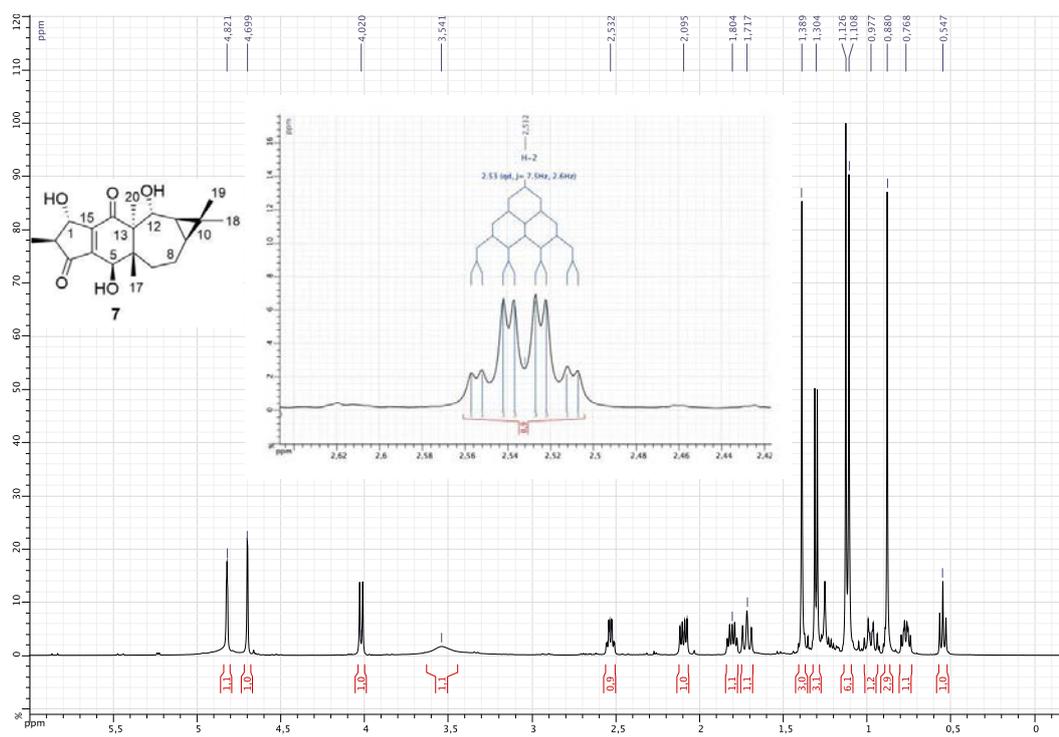
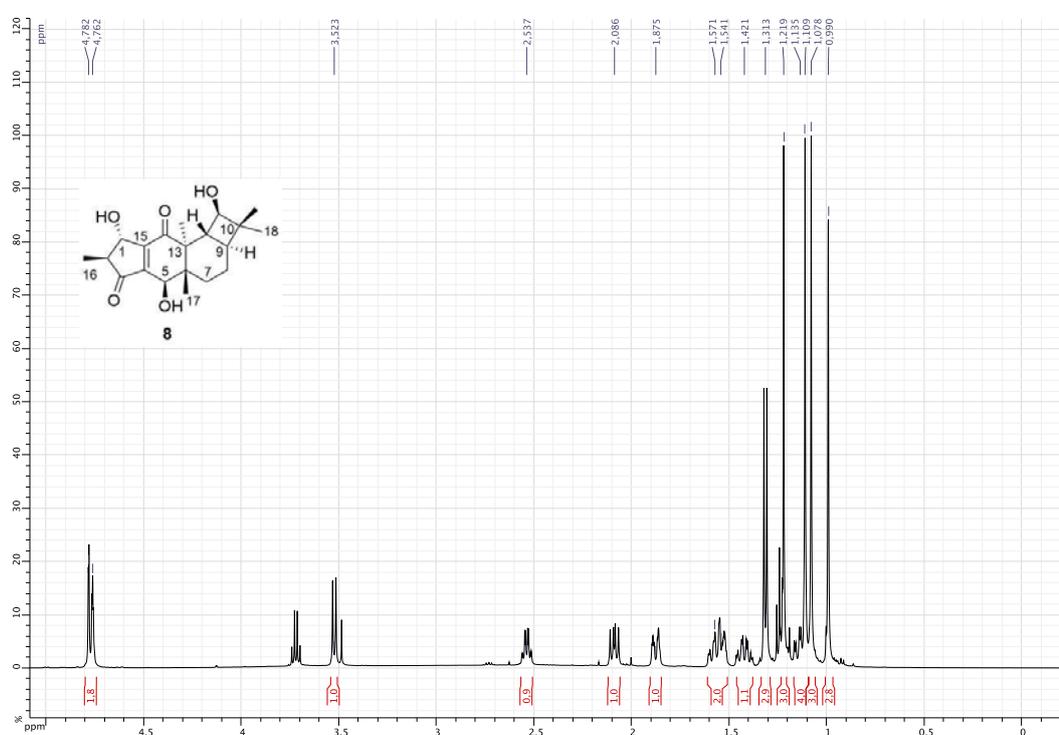
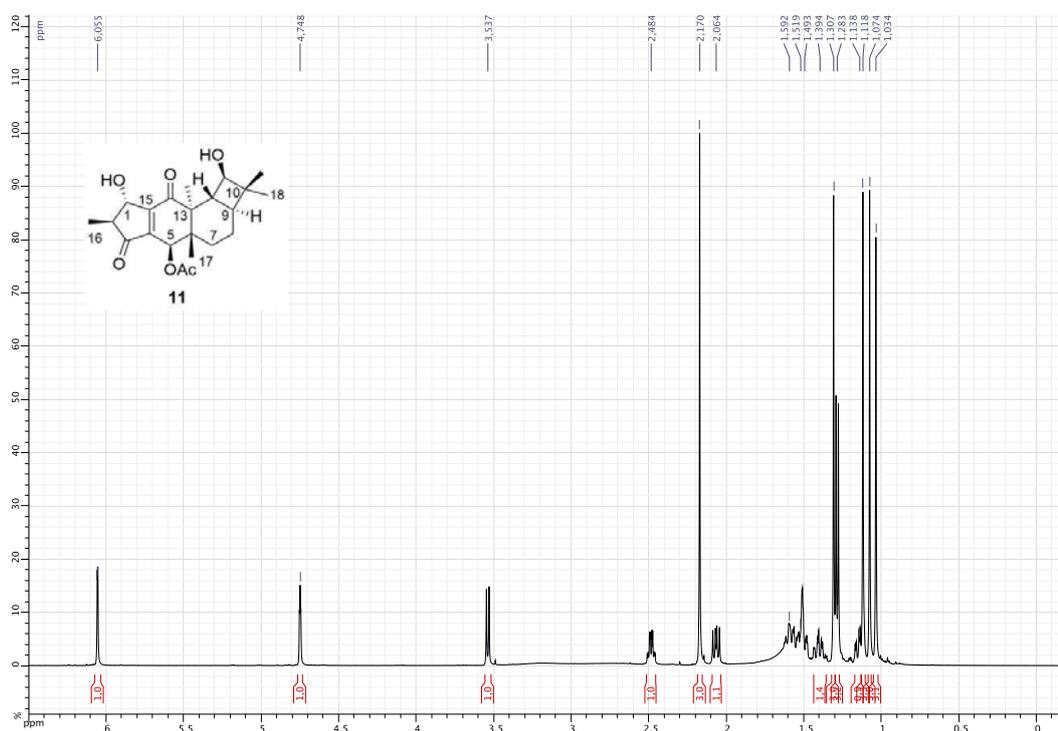
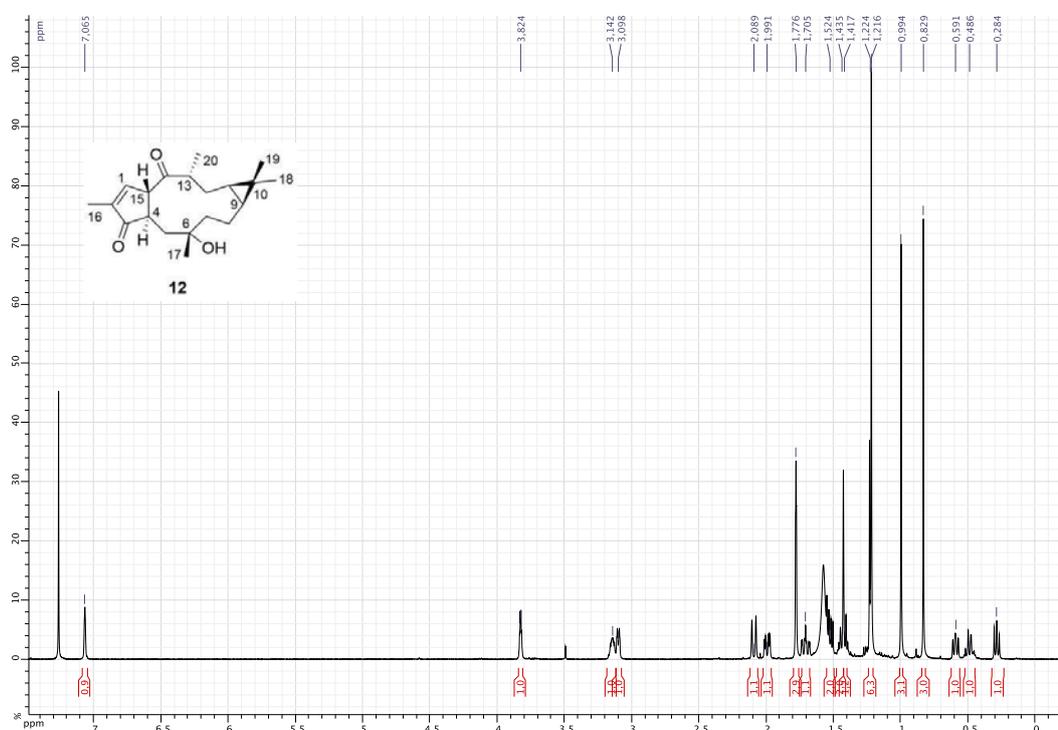
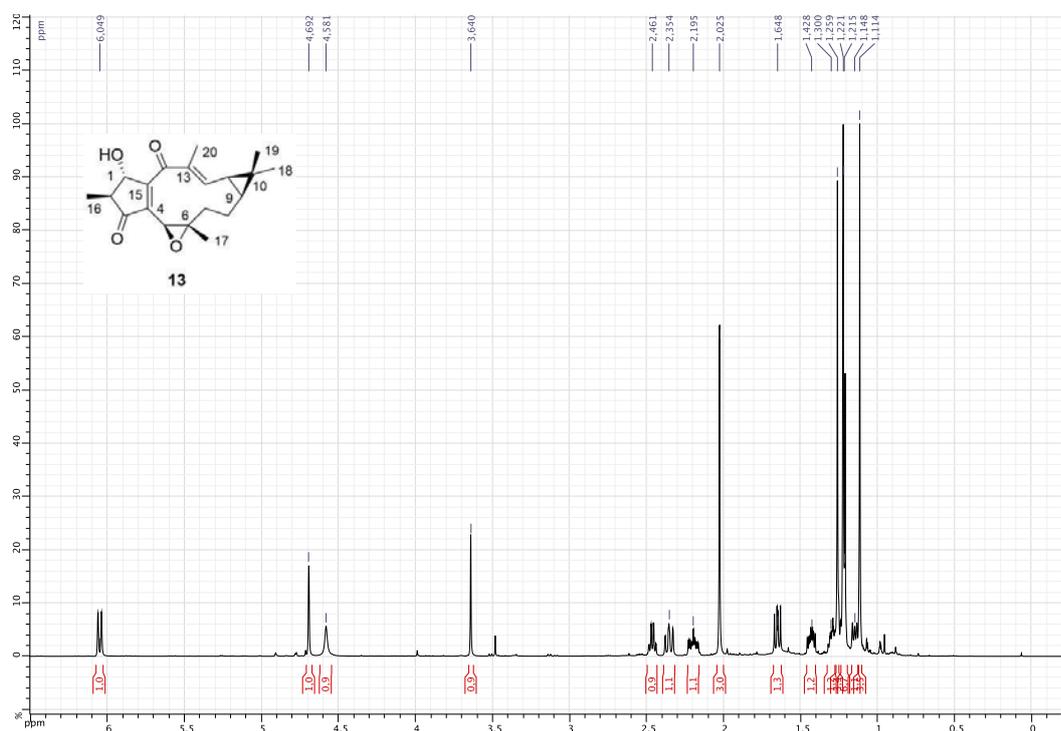
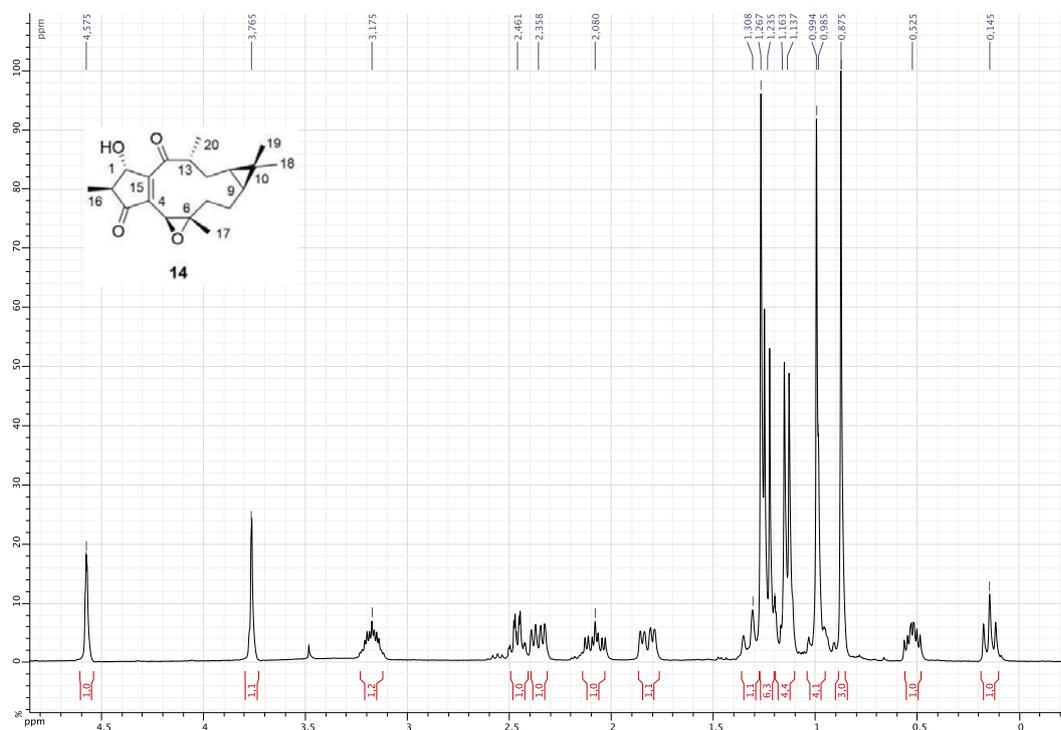


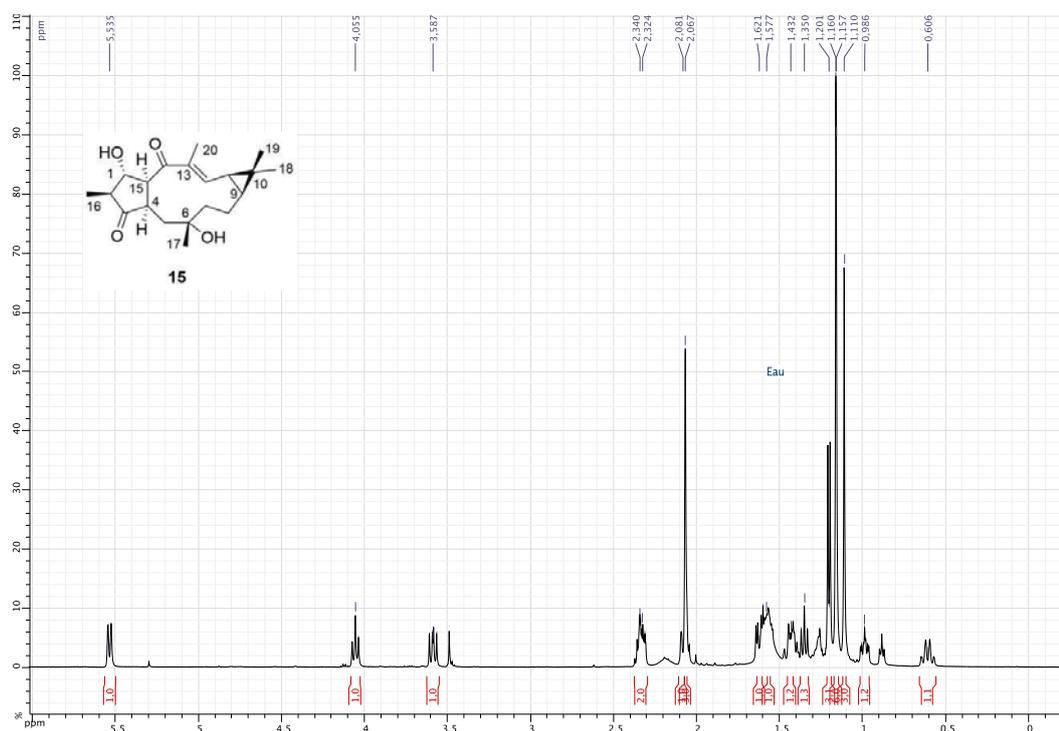
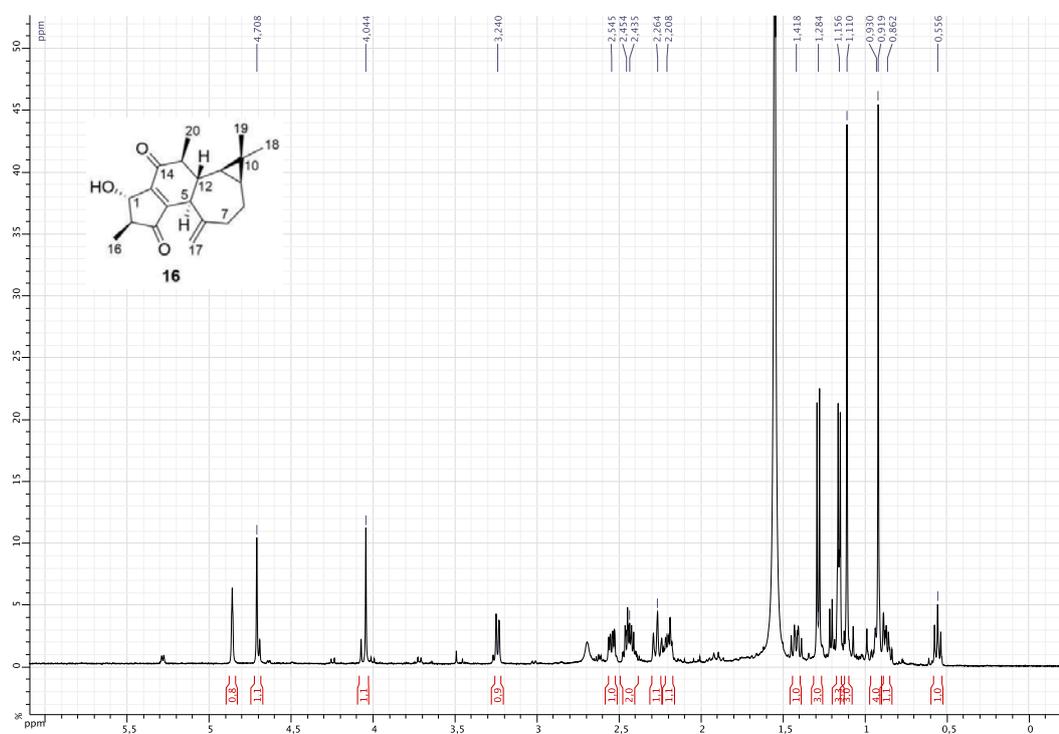
FIGURE 53 – Spectre ^1H du composé **4** (500 MHz, MeOD)

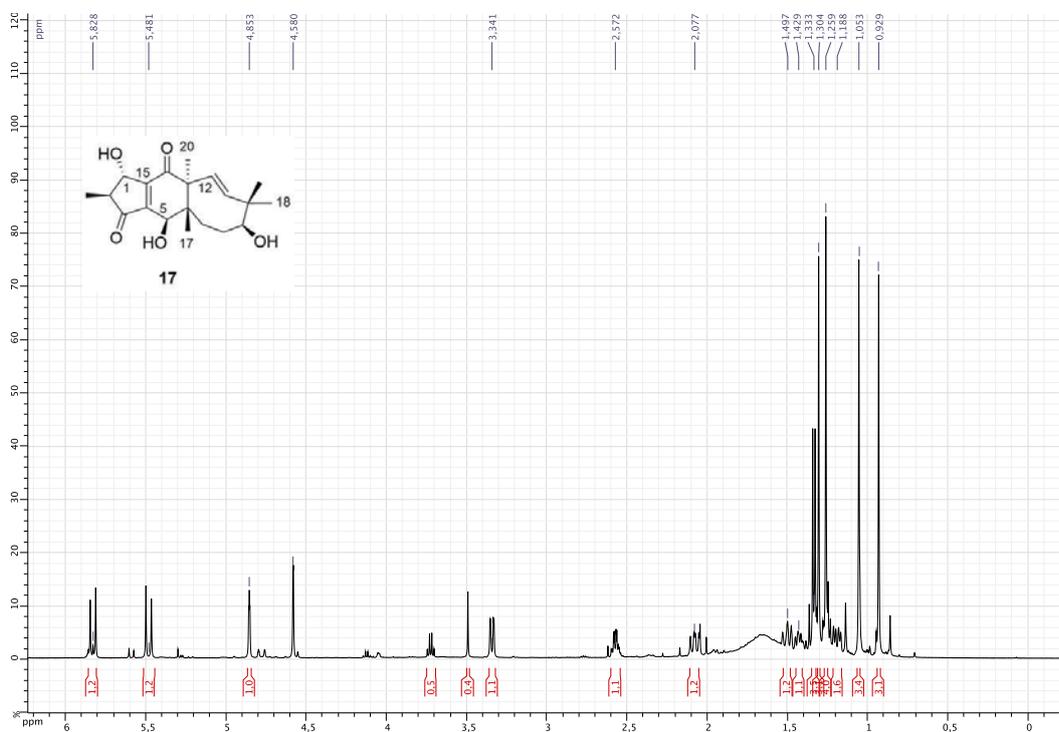
FIGURE 54 – Spectre ^1H du composé **5** (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 55 – Spectre ^1H du composé **6** (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 56 – Spectre ^1H du composé 7 (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 57 – Spectre ^1H du composé 8 (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 60 – Spectre ^1H du composé **11** (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 61 – Spectre ^1H du composé **12** (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 62 – Spectre ^1H du composé **13** (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 63 – Spectre ^1H du composé **14** (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 64 – Spectre ^1H du composé **15** (500 MHz, CDCl_3)FIGURE 65 – Spectre ^1H du composé **16** (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 66 – Spectre ^1H du composé **17** (500 MHz, CDCl_3)

Annexe C

Spectres RMN 2D

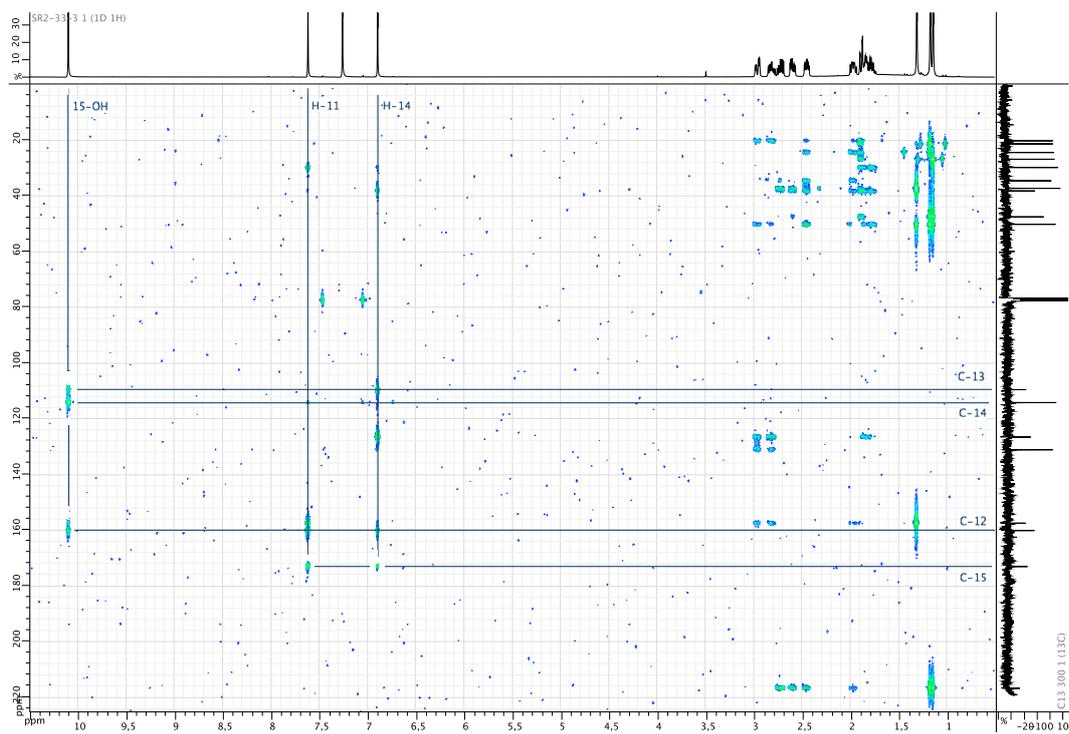
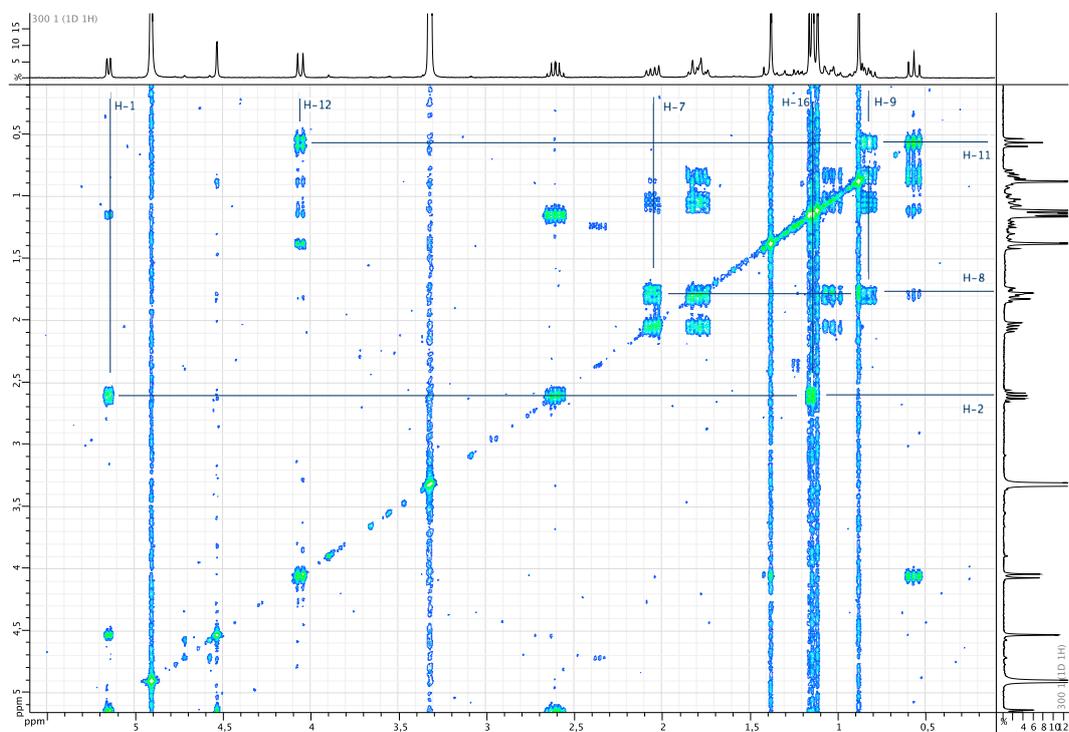
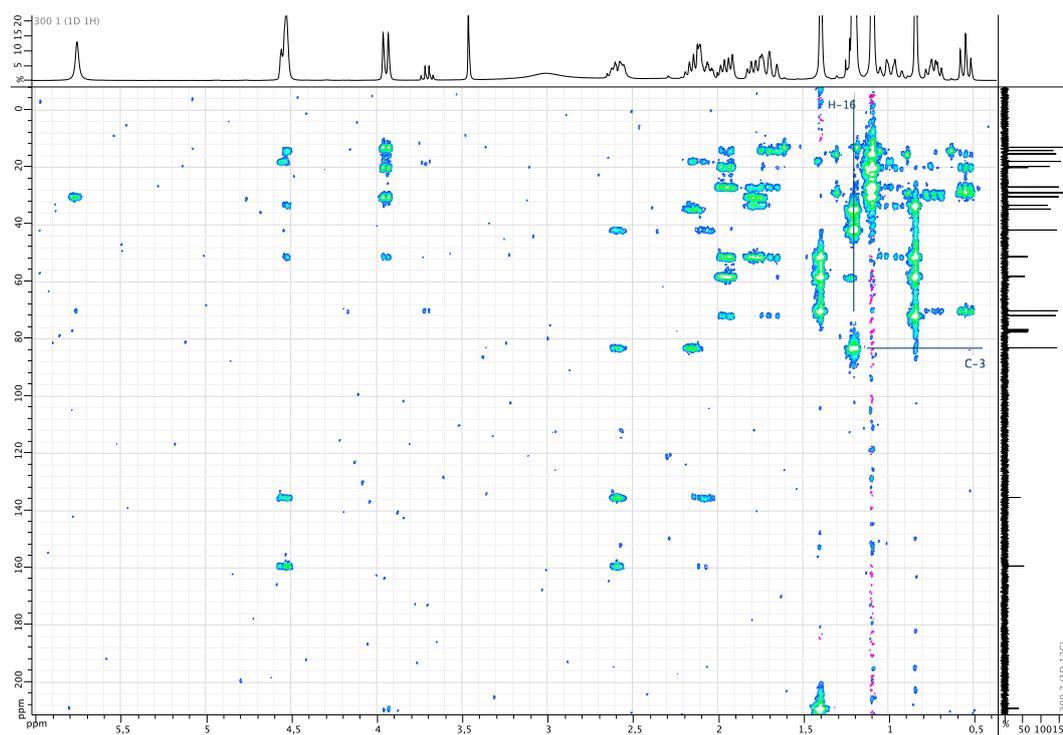
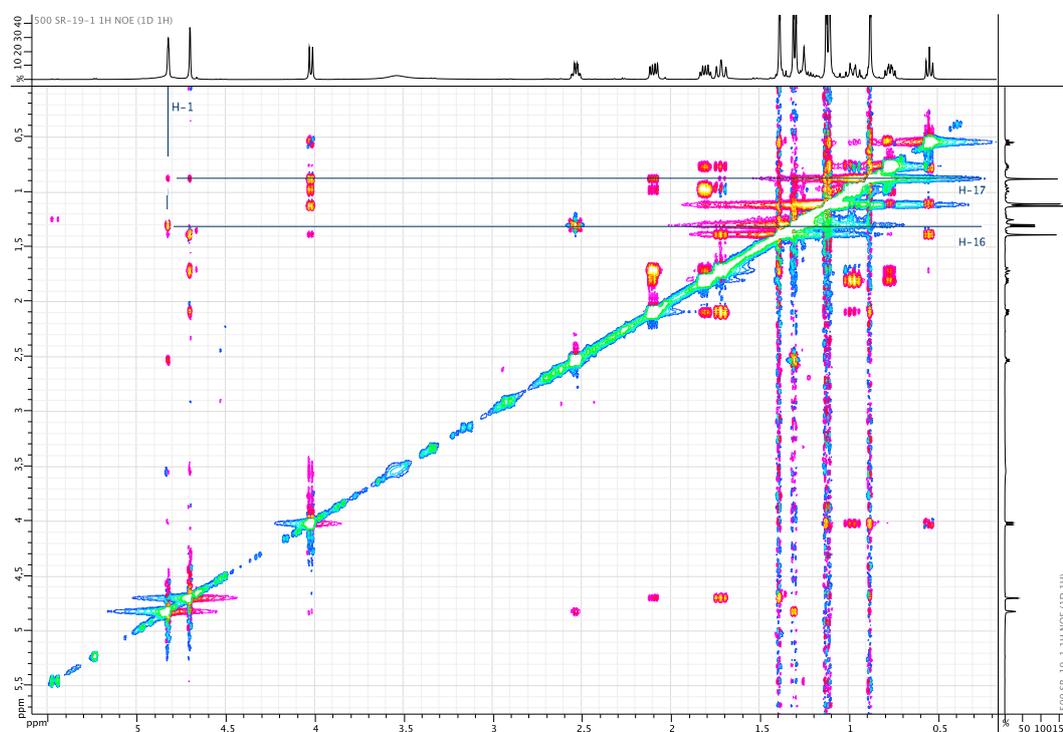
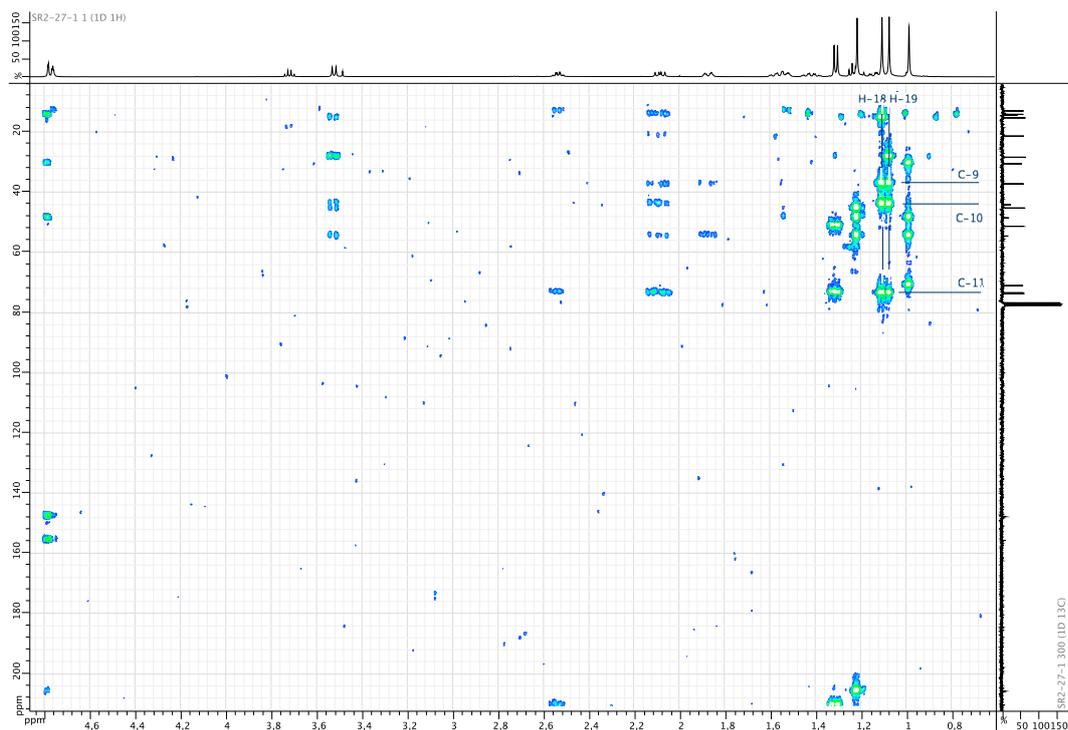
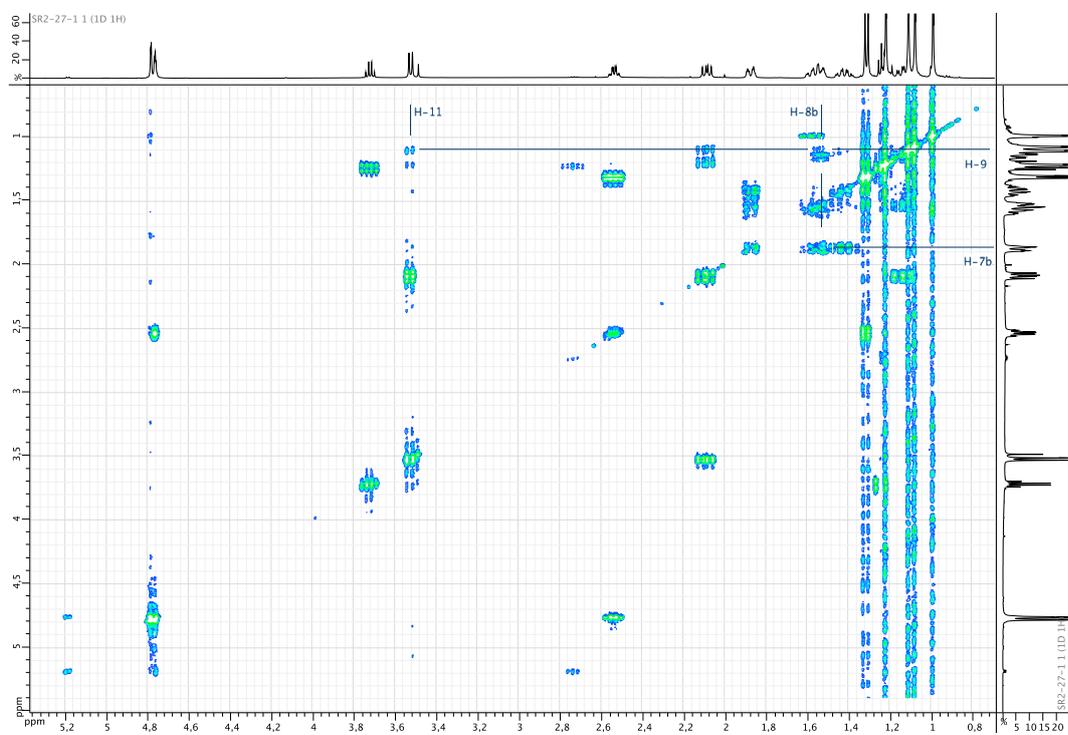
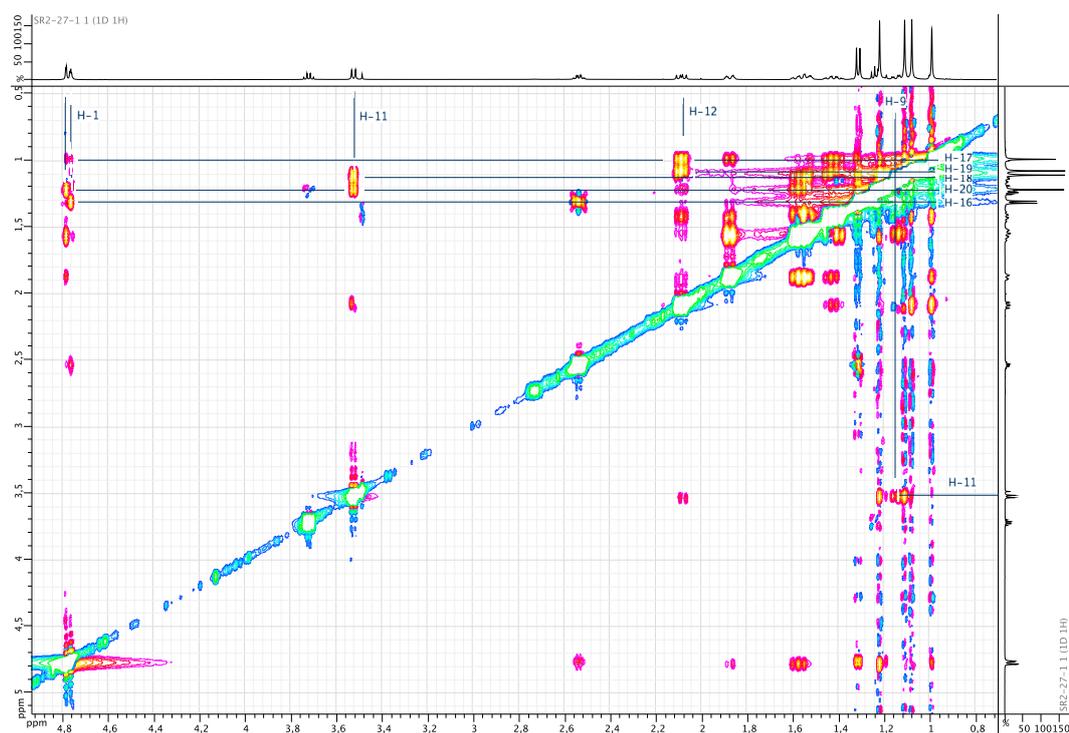
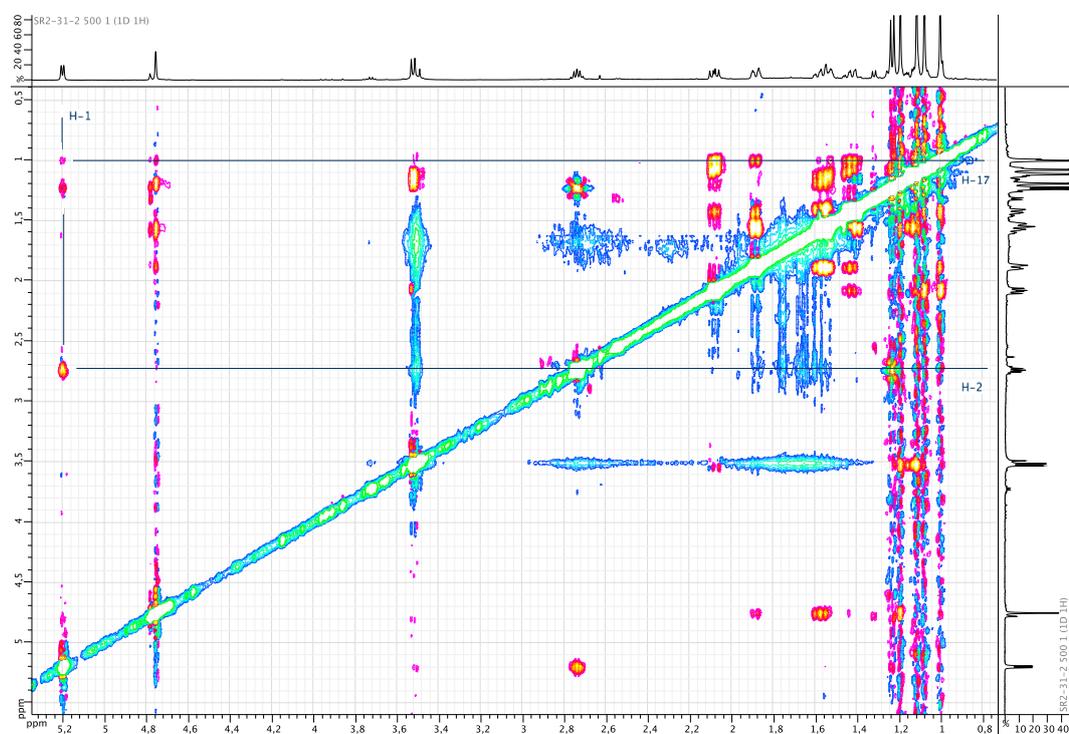
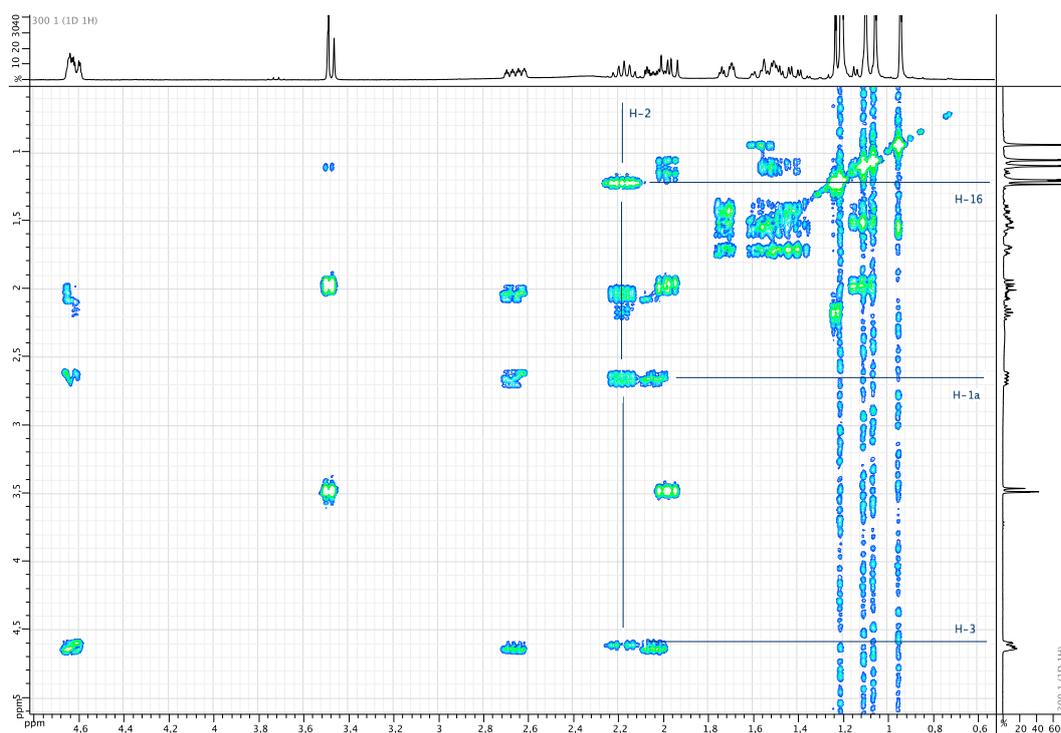
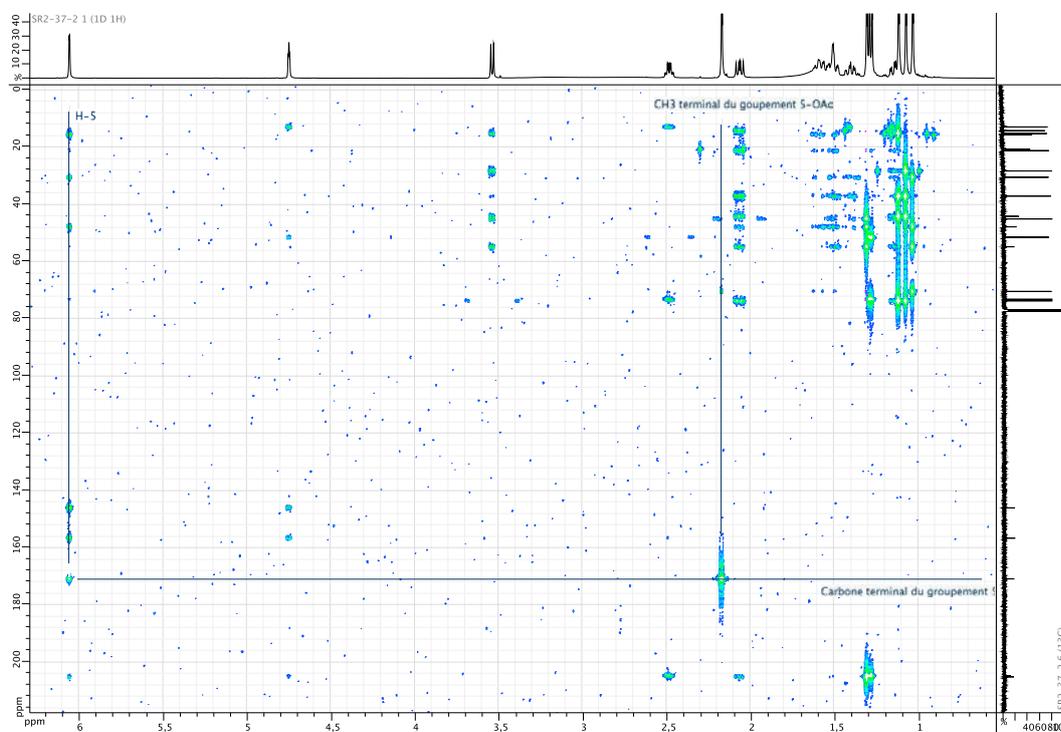
FIGURE 67 – Spectre HMBC du composé 3 (500 MHz, CDCl_3)

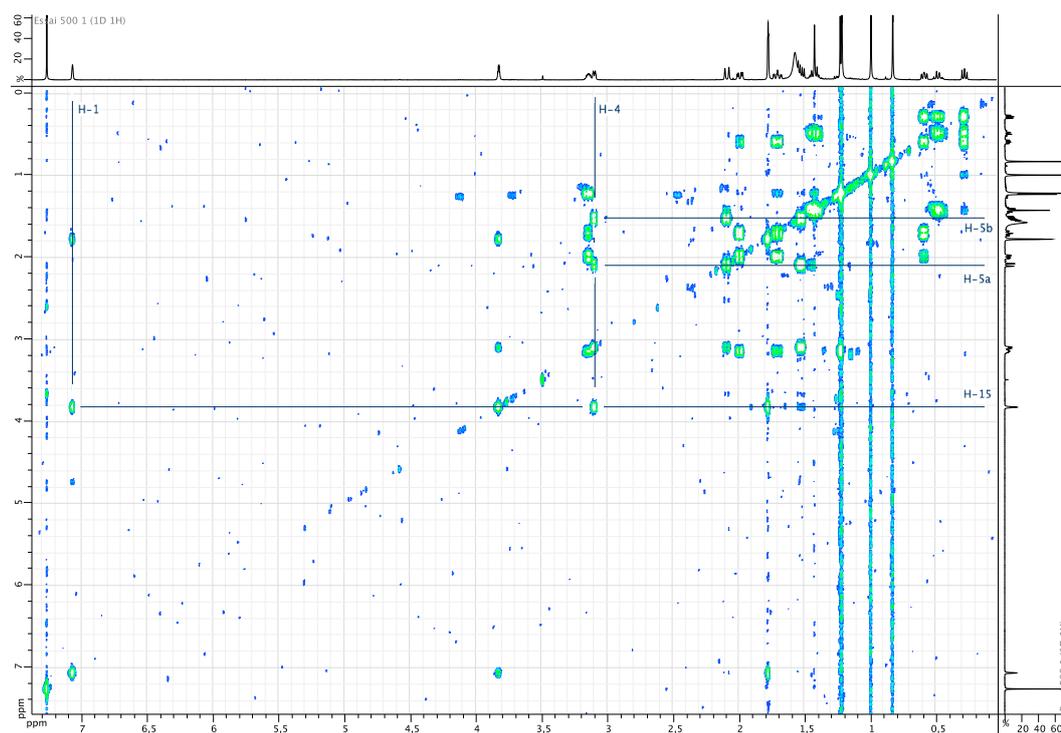
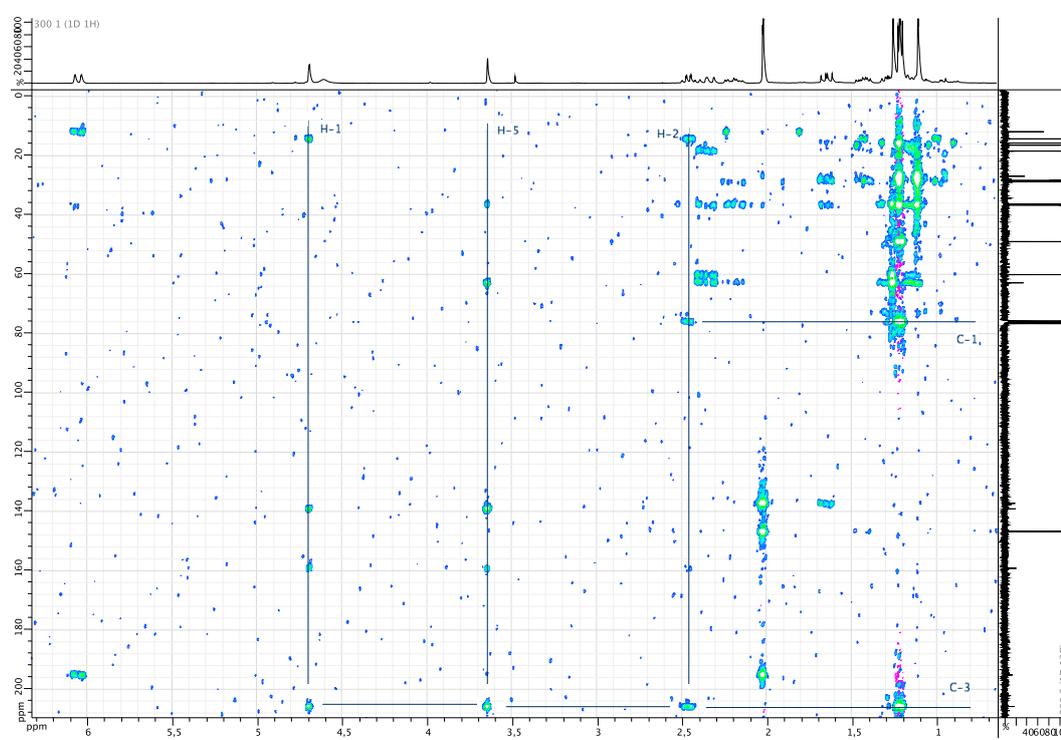
FIGURE 68 – Spectre COSY du composé 4 (300 MHz, MeOD)

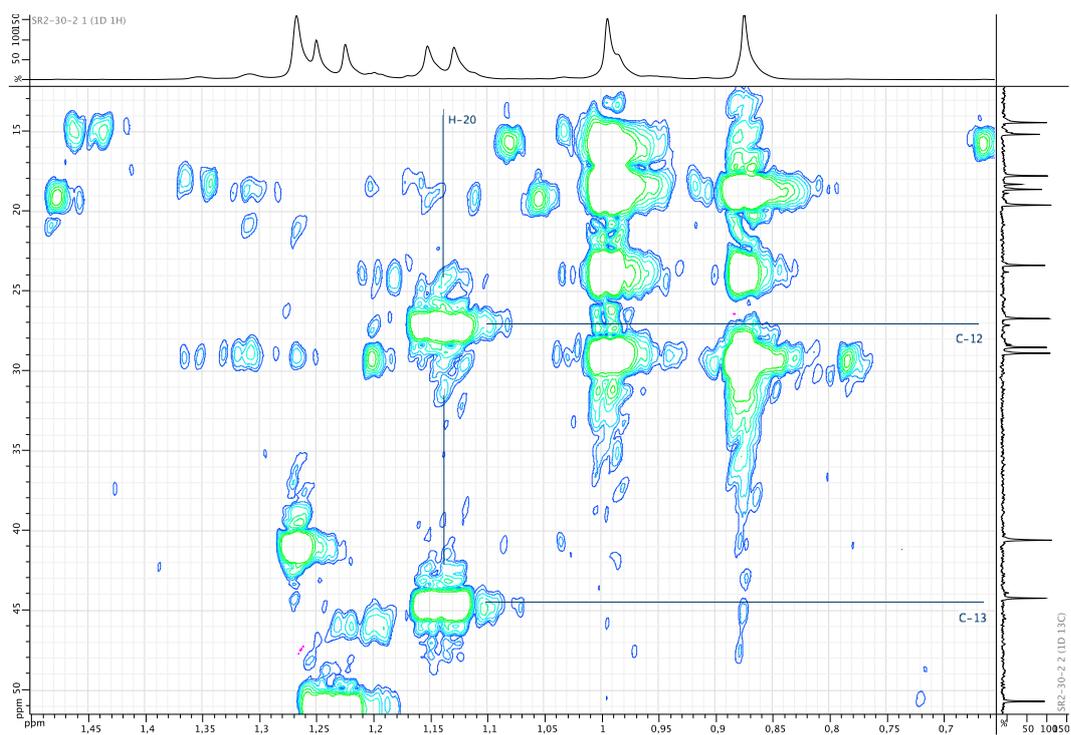
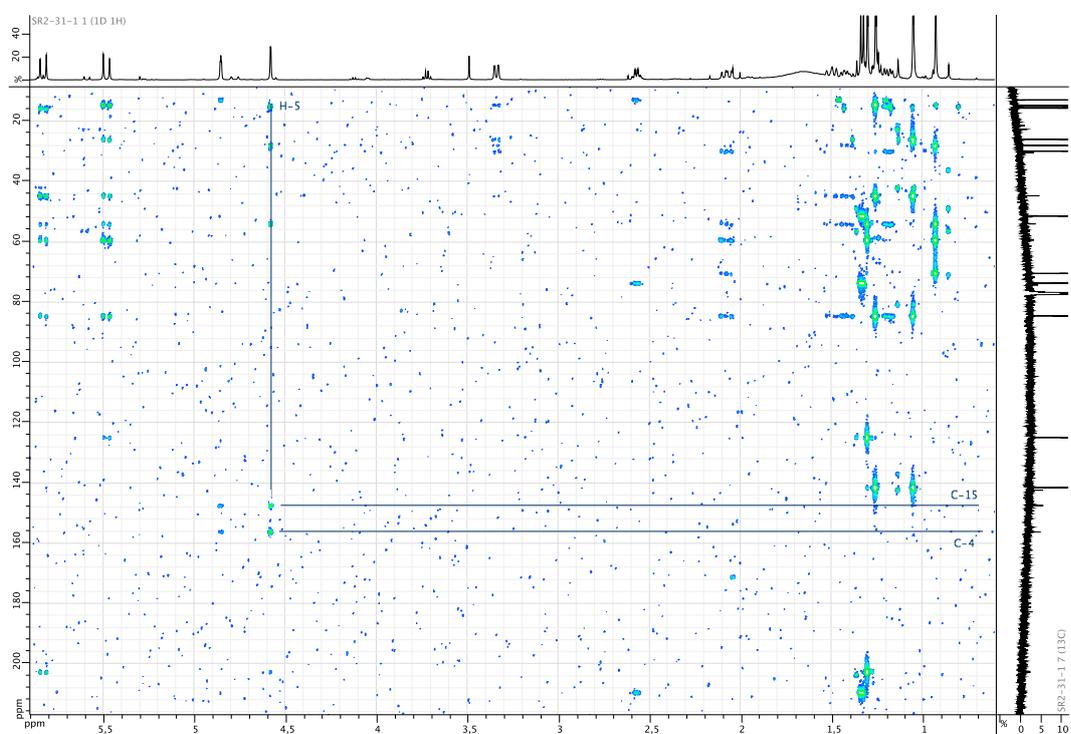
FIGURE 69 – Spectre COSY du composé **6** (300 MHz, CDCl_3)FIGURE 70 – Spectre NOESY du composé **7** (500 MHz, CDCl_3)

FIGURE 71 – Spectre HMBC du composé 8 (300 MHz, CDCl₃)FIGURE 72 – Spectre COSY du composé 8 (300 MHz, CDCl₃)

FIGURE 73 – Spectre NOESY du composé 8 (500 MHz, CDCl₃)FIGURE 74 – Spectre NOESY du composé 9 (500 MHz, CDCl₃)

FIGURE 75 – Spectre COSY du composé 10 (500 MHz, CDCl₃)FIGURE 76 – Spectre HMBC du composé 11 (500 MHz, CDCl₃)

FIGURE 77 – Spectre COSY du composé **12** (500 MHz, CDCl₃)FIGURE 78 – Spectre HMBC du composé **13** (300 MHz, CDCl₃)

FIGURE 79 – HMBC C-12/H-20/C-13 du composé 14 (300 MHz, CDCl_3)FIGURE 80 – Spectre HMBC du composé 17 (500 MHz, CDCl_3)

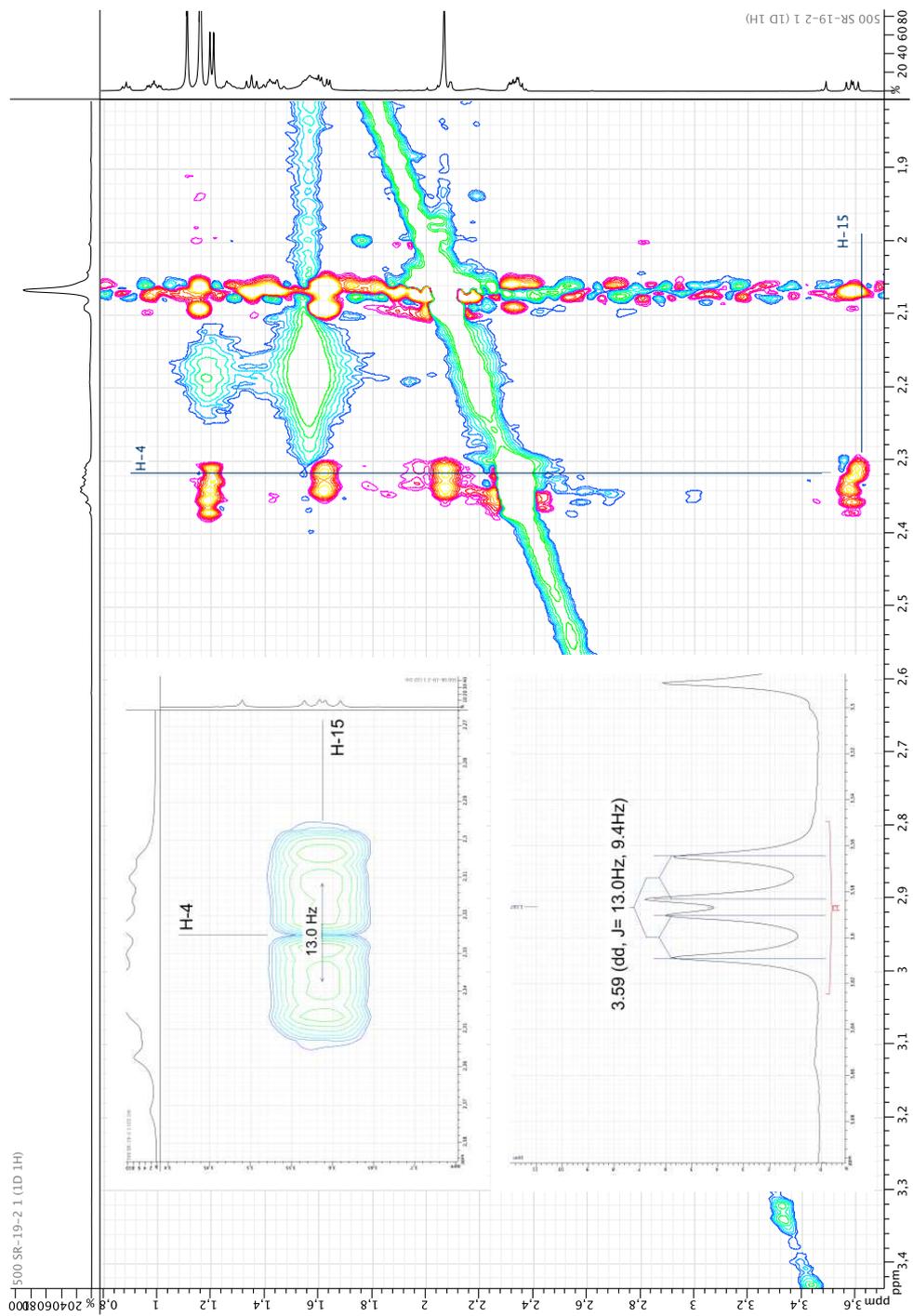
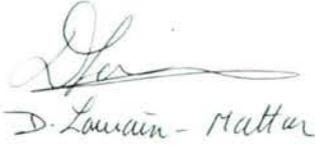


FIGURE 81 – Spectre NOESY entre H-4 et H-15 du composé 15. Mesure de la constante de couplage $^3J_{\text{H-4/H-15}}$ sur le spectre COSY (insert haut) et sur le spectre ^1H (insert bas) (500 MHz, CDCl_3)

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29/09/2017

<p style="text-align: center;">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Simon Remy</p> <p><u>Sujet</u> : Les diterpènes d'Euphorbiaceae : origines biosynthétiques et intérêts pharmaceutiques - étude de <i>Sandwithia guyanensis</i></p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur Directeur : M. Marc LITAUDON, Docteur, Pharmacien Juges : Mme Rosella SPINA, Docteur, Pharmacien Mme Frédéric BOURGAUD, Docteur</p>	<p style="text-align: center;">Vu, Nancy, le 3 mars 2017</p> <p style="text-align: center;">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p style="text-align: center;">M. M. Marc LITAUDON</p> <p style="text-align: center;">  <i>D. Laurain-Mattar</i>  </p>
<p style="text-align: center;">Vu et approuvé, Nancy, le 31.08.2017</p> <p style="text-align: center;">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p style="text-align: center;">  Francine PAULUS  </p>	<p style="text-align: center;">Vu, Nancy, le - 5 SEP. 2017</p> <p style="text-align: center;">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p style="text-align: center;">  Pierre MUTZENHARDT  </p> <p>N° d'enregistrement : 9967</p>

N° d'identification :

TITRE

Les diterpènes d'Euphorbiaceae : origines biosynthétiques et intérêts pharmaceutiques – Étude de *Sandwithia guyanensis*

Thèse soutenue le 29/09/2017

Par **Simon REMY**

RESUME :

Les Euphorbiaceae constituent l'une des plus grandes familles de plantes supérieures et sont caractérisées par la production d'une grande diversité de métabolites spécialisés dont les diterpènes macrocycliques. Ces derniers font l'objet de nombreux programmes de recherche de nouveaux médicaments en raison de la variété de leurs activités biologiques.

La première partie de ce travail est consacrée à la description des voies de biosynthèses de ces composés et à leur intérêt en chimie pharmaceutique.

La seconde partie concerne l'étude phytochimique de l'écorce de *S. guyanensis*, une Euphorbiaceae provenant de Guyane dont l'extrait possède des propriétés antivirales (virus du chikungunya). Dans un premier temps, l'isolement et la caractérisation structurale de dix-sept molécules nouvelles appartenant à six squelettes différents sont décrits. Puis, l'évaluation biologique de ces composés est présentée et des hypothèses biosynthétiques des familles chimiques les plus rares sont proposées.

Enfin, l'origine de la diversité chimique des diterpènes est discutée en considérant leur rôle biologique, leur place dans le métabolisme végétal et leur intérêt du point de vu de l'évolution.

MOTS CLES : diterpènes, métabolite spécialisé, plante, Euphorbiaceae, biosynthèse, chikungunya, euphoractane, lathyrane, jatropholane, euphactine, phenanthrèneoïde, phorbol, TPA, EBC46, prostratine

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr. Marc Litaudon	Institut de Chimie des Substances Naturelles	Expérimentale X
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème 3

Thèmes

1 – Sciences fondamentales	2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament	4 – Alimentation – Nutrition
5 – Biologie	6 – Pratique professionnelle