# Recherche d'inhibiteurs de virus émergents au sein de la biodiversité néo-calédonienne

Pierre-Marie Allard

▶ **To cite this version:**

Pierre-Marie Allard. Recherche d'inhibiteurs de virus émergents au sein de la biodiversité néo-calédonienne. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114849 . tel-00666200

**HAL Id: tel-00666200**

**https://theses.hal.science/tel-00666200**

Submitted on 3 Feb 2012

**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.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY


**ÉCOLE DOCTORALE** :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

*PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE*


ANNÉE 2008 - 2011 SÉRIE DOCTORAT N° 1130


**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenue publiquement le 19/12/2011

par


**Pierre-Marie ALLARD**


# Recherche d'inhibiteurs de virus émergents au sein de la biodiversité néo-calédonienne

**Composition du jury :**

| | | |
|---|---|---|
| Joël BOUSTIE | Professeur à l'Université de Rennes 1 | *Rapporteur* |
| Elisabeth SEGUIN | Professeur à l'Université de Rouen | *Rapporteur* |
| Jean-Claude GUILLEMOT | Professeur à l'Université Aix-Marseille | *Examinateur* |
| Pierre CHAMPY | Maître de Conférences à l'Université Paris-Sud 11 | *Examinateur* |
| Françoise GUERITTE | Directeur de Recherche (ICSN) | *Directrice de thèse* |
| Marc LITAUDON | Ingénieur de Recherche (ICSN) | *Co-directeur de thèse* |

# Résumé

Dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5 du virus de la dengue (DENV), un criblage a été mené sur 650 plantes néo-calédoniennes. A la suite de ce criblage, 2 espèces (*Cryptocarya chartacea* Kostermans et *Trigonostemon cherrieri* Veillon) ont été sélectionnées. L'extrait AcOEt des écorces de *Cryptocarya chartacea* (Lauraceae) a montré une forte inhibition de la NS5 polymérase (99 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$). L'étude phytochimique de l'extrait a mis en évidence une série de nouvelles flavanones 6-mono et 6,8-dialkylées, nommées chartacéones. Celles-ci sont présentes sous forme de mélange racémique au sein de *C. chartacea*. La chartacéone A a été purifiée sur colonne chirale conduisant à l'isolement de quatre diastéréoisomères optiquement purs. Une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de dichroïsme circulaire a permis la détermination de leur configuration absolue. Les chartacéones inhibent de façon sélective la NS5 polymérase du DENV. L'étude des extraits AcOEt des écorces et du bois de *Trigonostemon cherrieri* (Euphorbiaceae) a mis en évidence une série de métabolites secondaires originaux de types Diterpènes Daphnane Orthoester (DDO) chlorés : les trigocherrines (non-macrocycliques) et les trigocherriolides (macrocycliques). Ces composés présentent une inhibition de la NS5 polymérase du DENV et une activité antivirale sur le virus du Chikungunya *in cellulo*.

# Remerciements

Cette thèse et mes travaux de doctorat ont été menés au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette. Cet institut a été dirigé entre 2008 et 2011 par Messieurs les Professeurs Jean-Yves Lallemand, David Crich et Max Malacria. Je tiens à les remercier pour l'attribution d'une bourse de thèse et pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon doctorat au sein de l'ICSN.

J'exprime ma gratitude au Docteur Françoise Guéritte pour m'avoir accueilli dans son équipe et avoir dirigé mes travaux de thèse. Je remercie chaleureusement le Docteur Marc Litaudon, co-directeur de thèse, pour l'encadrement efficace, les discussions et le partage de son expérience de la chimie des substances naturelles au cours de ces trois années de travail commun. Je les remercie tous deux pour la sympathie et la confiance qu'ils m'ont témoignées durant mes années de thèse, l'aide et le temps qu'ils m'ont consacrés et l'ensemble des connaissances qu'ils m'ont apporté au cours de cette expérience.

Je tiens à remercier, à plusieurs titres, le Professeur Joël Boustie. Tout d'abord pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse de doctorat, mais également pour les cours de pharmacognosie dispensés avec passion lors de mon cursus de pharmacie à la faculté de Rennes, et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors d'un stage de recherche, en 2006. C'est sous sa direction et encadré par le Docteur Anne-Cécile Le Lamer, alors doctorante dans son laboratoire, que j'ai découvert le monde de la recherche et de la phytochimie.

Je souhaite également remercier le Professeur Jean-Claude Guillemot pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse mais aussi pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire d'Architecture et Fonctions des Macromolécules Biologiques (AFMB-UMR6098) de Marseille. Je tiens également à remercier le Docteur Cécilia Eydoux de l'AFMB pour son encadrement attentif et sa patience lors de mon séjour à Marseille ainsi que pour la réalisation de l'ensemble des essais biologiques sur le virus de la dengue.

Je remercie le Professeur Elisabeth Seguin et le Docteur Pierre Champy pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse et participé au jury en tant que rapporteur et examinateurs, respectivement.

Un grand MERCI au Docteur Marie-Elise Tran Huu Dauu, de l'équipe de modélisation moléculaire, pour s'être lancée sans réticence dans les calculs de dichroïsme circulaire, pour les heures de cluster, l'explication de formules obscures sur les publications de chimie quantique et, plus que tout, pour son entrain, sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci Elise !

L'expertise du Docteur Marie-Thérèse Martin, spectroscopiste à l'ICSN, a été déterminante dans les travaux d'élucidation structurale des produits isolés au cours de ma thèse. Je la remercie pour avoir partager avec moi un peu de sa grande expérience de la RMN mais également pour les échanges et les discussions autour de centres d'intérêts communs plus éloignés de la chimie mais tout aussi passionnants !

Merci à ces deux « grandes dames » de l'ICSN !

Je voudrais également remercier chaleureusement toute l'équipe du service HPLC : Odile, Nathalie, Suzanne et Franck pour leur aide précieuse et la bonne ambiance qui règne dans leurs labos !

De façon plus générale, et en oubliant surement des personnes, je souhaite remercier tous les services de l'ICSN et, en particulier : Jean-François du service de RMN, Nicolas et Olinda du service de spectrométrie de masse, Mathilde, David, Guillaume et Julien du service informatique et Geneviève du service de cytotoxicité.

Je tiens a remercier tout particulièrement ceux qui forment l'équipe 45. Les « ainés », Françoise, Marc, Vincent et Fanny pour leurs sages conseils et leurs expériences partagés. Et toute la *team* (passée, présente et future) pour faire de ce labo un formidable endroit que je n'oublierai pas ! Un grand merci à Cécile, Mehdi, Jonathan, Mélanie, Aurélie (... toutes les Aurélies !), Jérem, Charlotte, Olga, Maëva, Erell, Claire (... toutes les Claires !), Guillaume, Barbara, Louis-Félix, Mialy, Anne-Laure, Anna ...

Je remercie également « les Guillou » et « les Dubois » pour les bons moments passés le midi (et à d'autres heures ...), les membres du CEI et bien d'autres croisés au cours de ces trois ans à l'ICSN.

Un remerciement spécial aux collocs (Alex, Nico, Sylvain « Mc Fly », Vince, Jo ...) que j'ai connu pendant ces trois ans et qui, en rentrant le soir, rappellent que le monde tourne ... à l'extérieur du labo !

Enfin, un merci du fond du cœur à mes parents qui m'ont éduqué, toujours soutenu et encouragé de façon inconditionnelle et qui m'ont transmis leur curiosité pour l'étranger, l'inconnu et la Nature ... Merci à ma sœur, Sophie, d'avoir toujours été là. Merci la famille !

Merci à Natalia pour son soutien sans faille, sa patience, son courage, son sourire magique et son amour ! Gracias peque !

# Table des matières

**Résumé** **i**

**Remerciements** **iii**

**Table des matières** **vii**

**Liste des Figures** **xv**

**Liste des Tableaux** **xxv**

**Liste des Abréviations** **xxvii**

**Introduction générale** **3**

**I Partie Introductive** **7**

**1 Le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa** **11**

1.1 Situation géographique et historique . . . . . 11

1.2 Axes de recherche et résultats . . . . . 14

1.2.1 Période 1967-1985 . . . . . 14

1.2.2 Période 1986-actuelle . . . . . 18

1.3 Bilan et situation actuelle . . . . . 20

**2 Le virus de la dengue et l'intérêt de la NS5 polymérase comme cible thérapeutique** **23**

2.1 La dengue : une maladie infectieuse (ré)émergente . . . . . 24

2.1.1 Historique . . . . . 24

2.1.2 Épidémiologie et répartition actuelle . . . . . 26
2.1.3 Symptomatologie . . . . . 29
2.2 Le virus de la dengue . . . . . 33
2.2.1 Cycle de vie . . . . . 33
2.2.2 Protéines virales et cibles thérapeutiques . . . . . 36
2.2.2.1 Protéines structurales . . . . . 36
2.2.2.2 Protéines non-structurales . . . . . 42

**3 Essai biologique RdRp NS5 polymérase utilisé dans cette étude 49**

**II *Cryptocarya chartacea* : Étude chimique et activités biologiques 55**

**1 Étude bibliographique 59**
1.1 La famille des Lauraceae . . . . . 59
1.1.1 Classification des Lauraceae . . . . . 59
1.1.2 Répartition géographique . . . . . 60
1.1.3 Critères de reconnaissance . . . . . 61
1.1.4 Intérêt économique et utilisations traditionnelles . . . . . 62
1.2 Le genre *Cryptocarya* et l'espèce *Cryptocarya chartacea* . . . . . 63
1.2.1 Description botanique . . . . . 63
1.2.1.1 Genre *Cryptocarya* . . . . . 63
1.2.1.2 Espèce *Cryptocarya chartacea* Kostermans . . . . . 63
1.2.2 Répartition géographique . . . . . 65
1.2.3 Intérêt économique et utilisations traditionnelles . . . . . 65
1.3 Composition chimique du genre *Cryptocarya* . . . . . 67
1.3.1 Alcaloïdes . . . . . 67
1.3.2 $\alpha$-pyrones . . . . . 70
1.3.3 Flavanones complexes . . . . . 72

**2 Travaux personnels 79**
2.1 Étude phytochimique de *Cryptocarya chartacea* . . . . . 79
2.1.1 Récolte et identification . . . . . 79
2.1.2 Résultats préliminaires . . . . . 80

2.1.3 Extraction et purification des chartacéones . . . . . 80
2.1.4 Caractérisation des composés isolés . . . . . 84
2.1.4.1 Chartacéone A . . . . . 85
2.1.4.2 Chartacéone B . . . . . 88
2.1.4.3 Chartacéones C, D, E et F . . . . . 90
2.2 Analyse configurationnelle des chartacéones . . . . . 92
2.2.1 Analyse configurationnelle de la chartacéone A . . . . . 92
2.2.1.1 Séparation des diastéréoisomères de la chartacéone A . 92
2.2.1.2 Dichroïsme circulaire des chartacéones A1-A4 . . . . . 93
2.2.2 Analyse configurationnelle de la chartacéone B . . . . . 99
2.2.2.1 Séparation des diastéréoisomères de la chartacéone B . 99
2.2.2.2 Dichroïsme circulaire des chartacéones B1-B4 . . . . . 100
2.2.3 Purification des chartacéones bisubstituées . . . . . 102
2.3 Activités biologiques . . . . . 103
2.3.1 Inhibition de la NS5 polymérase (DENV) et cytotoxicité . . . . . 103
2.3.2 Sélectivité vis-à-vis d'autres polymérases virales . . . . . 105

**Conclusion de la Partie II** **107**

**III *Trigonostemon cherrieri* : Étude chimique et activités biologiques** **109**

**1 Étude bibliographique** **113**
1.1 La famille des Euphorbiaceae . . . . . 114
1.1.1 Classification des Euphorbiaceae . . . . . 114
1.1.2 Répartition géographique . . . . . 115
1.1.3 Critères de reconnaissance . . . . . 115
1.1.4 Intérêt économique, utilisations traditionnelles et activités biologiques . . . . . 115
1.2 Le genre *Trigonostemon* et l'espèce *Trigonostemon cherrieri* Veillon . . 118
1.2.1 Description botanique . . . . . 119
1.2.1.1 Le genre *Trigonostemon* . . . . . 119
1.2.1.2 L'espèce *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 120

1.2.2 Utilisations traditionnelles . . . 123
1.2.3 Composition chimique du genre *Trigonostemon* . . . 123
1.2.3.1 Phénanthrènes du genre *Trigonostemon* . . . 124
1.2.3.2 Alcaloïdes du genre *Trigonostemon* . . . 124
1.2.3.3 Diterpénoïdes du genre *Trigonostemon* . . . 124
1.2.4 Activités biologiques des métabolites secondaires du genre *Trigonostemon* . . . 128
1.3 Les orthoesters . . . 131
1.3.1 Catégories d'orthoesters . . . 131
1.3.1.1 DDO . . . 131
1.3.1.2 Limonoïdes . . . 134
1.3.1.3 Stéroïdes . . . 135
1.3.2 Activités biologiques des DDO . . . 136
1.3.2.1 Activation des récepteurs TRPV1 . . . 136
1.3.2.2 Activité cytotoxique . . . 137
1.3.2.3 Activité antivirale . . . 139
1.4 Les composés organohalogénés . . . 142
1.4.1 Importance et occurrence naturelle . . . 142
1.4.2 Intérêts et fonctions biologiques . . . 142
1.4.3 Diterpènes halogénés chez les végétaux supérieurs . . . 144
1.4.4 Biosynthèse des composés halogénés . . . 145

**2 Travaux personnels 149**
2.1 Étude phytochimique de *Trigonostemon cherrieri* . . . 149
2.1.1 Récolte et identification . . . 150
2.1.2 Résultats préliminaires . . . 150
2.1.3 Extraction et purification d'une série de DDO halogénés . . . 151
2.1.3.1 Extrait d'écorces . . . 154
2.1.3.2 Extrait de bois de cœur . . . 155
2.1.3.3 Bilan des deux extractions . . . 155
2.1.4 Caractérisation des composés isolés . . . 162
2.1.4.1 Trigocherrine A . . . 163
2.1.4.2 Trigocherrine B . . . 169

2.1.4.3 Trigocherrine C . . . . . 172
2.1.4.4 Trigocherrine D . . . . . 175
2.1.4.5 Trigocherrine E . . . . . 178
2.1.4.6 Trigocherrine F . . . . . 181
2.1.4.7 Trigocherriolide A . . . . . 184
2.1.4.8 Trigocherriolide B . . . . . 192
2.1.4.9 Trigocherriolide C . . . . . 196
2.1.4.10 Trigocherriolide D . . . . . 197
2.1.5 Configuration absolue de la trigocherrine A . . . . . 199
2.2 Hypothèse biogénétique de formation des DDO halogénés de *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 202
2.3 Activités biologiques . . . . . 208
2.3.1 Activité biologique sur le virus de la dengue . . . . . 208
2.3.2 Activité biologique sur le virus du chikungunya . . . . . 208

**Conclusion de la Partie III** **213**

**Conclusion générale** **217**

**IV Partie Expérimentale** **221**

**1 Procédures générales** **223**
1.1 Solvants et réactifs . . . . . 223
1.2 Fractionnements, purifications et suivi des réactions . . . . . 223
1.2.1 Chromatographie sur couches mince . . . . . 223
1.2.2 Chromatographie sur colonne (CC) . . . . . 224
1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP) . . . . . 224
1.2.3.1 CLHP en phase inverse . . . . . 224
1.2.3.2 CLHP-MS . . . . . 225
1.2.3.3 CLHP chirale . . . . . 225
1.2.3.4 SFC . . . . . 225
1.3 Analyses physiques et spectrales des composés . . . . . 225
1.3.1 Pouvoir rotatoire . . . . . 225

1.3.2 Dichroïsme circulaire . . . . . 225
1.3.3 Spectrométrie ultra-violet (UV) . . . . . 226
1.3.4 Spectrométrie de masse . . . . . 226
1.3.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN) . . . . . 226
1.4 Calculs théoriques et génération des courbes de DC . . . . . 227

**2 Extractions et purifications 229**
2.1 *Cryptocarya chartacea* Kosterm. . . . . 229
2.2 *Trigonostemon cherrieri* Veillon . . . . . 232
2.2.1 Extrait d'écorces . . . . . 232
2.2.2 Extrait de bois de cœur . . . . . 233

**3 Caractéristiques physiques et spectrales des produits naturels isolés 239**
3.1 *Cryptocarya chartacea* Kosterm. . . . . 240
3.2 *Trigonostemon cherrieri* Veillon . . . . . 249

**4 Essais biologiques 263**
4.1 Évaluation de l'inhibition de la NS5 RdRp du DENV . . . . . 263
4.2 Évaluation de l'inhibition du CHIKV *in cellulo* . . . . . 265
4.3 Évaluation de la cytotoxicité . . . . . 267

**Bibliographie 268**

**Annexes 291**

**1 Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C et DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC et HMBC) de la chartacéone A 291**

**2 Spectres RMN $^{1}$H et $^{13}$C des chartacéones B-F 295**

**3 Spectres HMBC des chartacéones D et E 301**

**4 Données RMN $^{1}$H des chartacéones de *Cryptocarya chartacea* 305**

**5 Données RMN $^{13}$C des chartacéones de *Cryptocarya chartacea* 307**

**6 Chartacéones isolées des écorces de *Cryptocarya chartacea* 309**

**7 Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) de la trigocherrine A 311**

**8 Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) du trigocherriolide A 319**

**9 Spectres RMN $^{1}$H des trigocherrines B-F et des trigocherriolides B-D325**

**10 Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C des trigocherrines de *Trigonostemon cherrieri* 335**

**11 Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C des trigocherriolides de *Trigonostemon cherrieri* 337**

**12 Composés isolés des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri* 339**

**Publications 343**

# Liste des Figures

**Partie Introductive** **9**

FIGURE 1 : Carte de la Nouvelle-Calédonie . . . . . 12
FIGURE 2 : Le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa . . . . . 14
FIGURE 3 : Alcaloïdes tropaniques isolés du genre *Knightia* . . . . . 16
FIGURE 4 : Homaline (**3**) et periphylline (**4**) . . . . . 16
FIGURE 5 : Ellipticine (**5**) et soulaméolide (**6**) . . . . . 17
FIGURE 6 : Turrianes isolés du genre *Kermadecia* . . . . . 19
FIGURE 7 : Ligands du récepteur hPPAR$\gamma$ isolés de plantes néo-calédoniennes. 20

FIGURE 8 : Distribution d'*Aedes aegypti* en Amérique du Sud . . . . . 26
FIGURE 9 : Changements dans la distribution des sérotypes de DENV - distribution en 1970 (**a**) et en 2004 (**b**) . . . . . 27
FIGURE 10 : Incidence de la dengue sur le continent américain . . . . . 28
FIGURE 11 : Zones avec risque de transmission du virus de la dengue en 2010 29
FIGURE 12 : Classification des symptômes de la dengue - OMS 1997 . . . . 29
FIGURE 13 : Classification des symptômes de la dengue - OMS 2009 . . . . 32
FIGURE 14 : Membres de la famille des Flaviviridae . . . . . 33
FIGURE 15 : Cycle réplicatif du virus de la dengue . . . . . 35
FIGURE 16 : Génome et polyprotéine du virus de la dengue . . . . . 36
FIGURE 17 : Protéine de Capside du DENV . . . . . 37
FIGURE 18 : Protéines d'enveloppe et membranaire au cours de la maturation du DENV . . . . . 38
FIGURE 19 : Représentation schématique de la protéine E du DENV . . . . 38
FIGURE 20 : Mécanisme de fusion médié par la protéine E . . . . . 40

FIGURE 21 : Inhibiteurs de l'entrée du DENV . . . . . 41
FIGURE 22 : Schéma du mécanisme antiviral des composés polyanioniques . 41
FIGURE 23 : **16** . . . . . 42
FIGURE 24 : **17** . . . . . 42
FIGURE 25 : Structure tridimensionnelle de l'hélicase du DENV et de son substrat : l'ARN viral . . . . . 44
FIGURE 26 : BP2109 (**18**) . . . . . 44
FIGURE 27 : ARDP0006 (**19**) . . . . . 45
FIGURE 28 : Panduratine A (**20**) et 4-démethyl-panduratine A(**21**) . . . . . 45
FIGURE 29 : Un inhibiteur peptidique de la NS3 du DENV (**22**) . . . . . 46
FIGURE 30 : Structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase ARN-dépendante du DENV . . . . . 46
FIGURE 31 : 7-deaza-2′-C-Me-adenosine (**23**) . . . . . 47
FIGURE 32 : NITD008 (**24**) . . . . . 47
FIGURE 33 : Hit Novartis (**25**) . . . . . 48
FIGURE 34 : Acide *N*-sulfonylanthranilique (**26**) . . . . . 48

FIGURE 35 : Principe du test d'évaluation du potentiel inhibiteur de l'activité NS polymérase du DENV . . . . . 50

***Cryptocarya chartacea* : Étude chimique et activités biologiques 57**

FIGURE 36 : Répartition mondiale des Lauraceae . . . . . 61
FIGURE 37 : Planche botanique de parties de *Cryptocarya longifolia* et *C. mackeei* . . . . . 64
FIGURE 38 : Photo des feuilles de *Cryptocarya chartacea* . . . . . 65
FIGURE 39 : Répartition de *Cryptocarya chartacea* Kosterm. . . . . 66
FIGURE 40 : Longifolidine (**27**) . . . . . 68
FIGURE 41 : Cryptodorine (**28**) . . . . . 68
FIGURE 42 : Néocaryachine (**29**) . . . . . 68
FIGURE 43 : Cryptaustoline (**30**) . . . . . 69
FIGURE 44 : Oubatchensine (**31**) . . . . . 69
FIGURE 45 : Cryptopleurine (**32**) . . . . . 69

FIGURE 46 : Phyllostemine (**33**) . . . . . 69
FIGURE 47 : Biogénèse des $\alpha$-pyrones et flavonoïdes . . . . . 70
FIGURE 48 : Massoïalactone (**34**) . . . . . 71
FIGURE 49 : Alkényle-lactone (**35**) . . . . . 71
FIGURE 50 : Goniothalamine (**36**) . . . . . 71
FIGURE 51 : Kurzilactone (**37**) . . . . . 71
FIGURE 52 : Obolactone (**38**) . . . . . 71
FIGURE 53 : Cryptocaryone (**39**) . . . . . 73
FIGURE 54 : Kurziflavolactone A (**40**) . . . . . 73
FIGURE 55 : Kurzichalcolactone (**41**) . . . . . 73
FIGURE 56 : Biogénèse des kurziflavolactones de *C. kurzii* . . . . . 74
FIGURE 57 : Infectocaryone (**42**) . . . . . 74
FIGURE 58 : Cryptocaryanones A (**43**) et B (**44**) . . . . . 74
FIGURE 59 : Bicaryanones A-D (**45**) . . . . . 75
FIGURE 60 : Chalcocaryanones A-B . . . . . 75
FIGURE 61 : Chalcocaryanones C-D . . . . . 75
FIGURE 62 : Oboflavanones A et B . . . . . 75
FIGURE 63 : Obochalcolactone (**46**) . . . . . 75
FIGURE 64 : Biogénèse de l'obochalcolatone de *C. obovata* . . . . . 76
FIGURE 65 : Cryptochinone A (**47**) . . . . . 76

FIGURE 66 : Carte de la Nouvelle-Calédonie, localisation du lieu de récolte à Port-Boisé (**A**) . . . . . 80
FIGURE 67 : Fractionnement standard des écorces de *Cryptocarya chartacea* 81
FIGURE 68 : Schéma d'extraction des composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea* . . . . . 83
FIGURE 69 : Composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea* . . . . . 84
FIGURE 70 : Chartacéone A (**49**) . . . . . 85
FIGURE 71 : Superposition des spectres RMN $^{1}$H de la pinocembrine (**48**) et de la chartacéone A (**49**) . . . . . 86
FIGURE 72 : Superposition du spectre RMN $^{13}$C de la pinocembrine (**48**) et des spectres DEPT-135 (vert) et $^{13}$C (noir) de la chartacéone A (**49**) . . . . . 86

FIGURE 73 : Corrélations clés de la chaîne latérale de la chartacéone A (**49**). COSY (gras) et HMBC (flèches) . . . . . 88
FIGURE 74 : Chartacéone B (**50**) . . . . . 88
FIGURE 75 : Superposition des spectres RMN $^{1}$H de la chartacéone A (**49**) (vert) et de la chartacéone B (**50**) (noir) . . . . . 89
FIGURE 76 : Corrélations clés de la chaîne latérale de la chartacéone B (**50**). COSY (gras) et HMBC (flèches) . . . . . 89
FIGURE 77 : Chartacéone C (**51**) . . . . . 90
FIGURE 78 : Chartacéone D (**52**) . . . . . 90
FIGURE 79 : Chartacéone E (**53**) . . . . . 90
FIGURE 80 : Chartacéone F (**54**) . . . . . 90
FIGURE 81 : Superposition des spectres RMN $^{1}$H des chartacéones C-F (**51-54**) . . . . . 92
FIGURE 82 : Chromatogramme de la purification chirale de la chartacéone A (**49**) . . . . . 93
FIGURE 83 : Courbes de dichroïsme circulaire des chartacéones A1-A4 (**55-58**) 93
FIGURE 84 : Structures tridimensionnelles de conformères de chartacéone A de configuration 2*(R)*,5″*(R)*, à gauche chaîne latérale repliée formant une liaison hydrogène avec l'OH-7, à droite chaîne latérale étendue. . . . . 96
FIGURE 85 : Superposition des courbes de DC calculées et expérimentales . 98
FIGURE 86 : Configuration absolue des chartacéones A1-A4 (**55-58**) . . . . 98
FIGURE 87 : Chromatogramme de la purification chirale de la chartacéone B (**50**) . . . . . 99
FIGURE 88 : Courbes de dichroïsme circulaire des chartacéones B1-B4 (**59-62**) 100
FIGURE 89 : Configuration en C-2 des chartacéones B1-B4 (**59-62**) . . . . . 101
FIGURE 90 : Influence des chaînes latérales des chartacéones sur l'inhibition de la NS5pol DENV . . . . . 104
FIGURE 91 : Liaisons hydrogènes formées par le NITD-29 au sein de son site d'action allostérique sur la NS5 polymérase du DENV . . . . . 104

## *Trigonostemon cherrieri* : Étude chimique et activités biologiques 111

FIGURE 92 : Répartition mondiale des Euphorbiaceae . . . . . 115
FIGURE 93 : *Ricinus communis* . . . . . 116
FIGURE 94 : *Manihot esculenta* . . . . . 116
FIGURE 95 : *Hevea brasiliensis* . . . . . 116
FIGURE 96 : Phorbol et esters de phorbol (PMA et PDBu) retrouvés chez des Euphorbiaceae . . . . . 117
FIGURE 97 : Répartition globale du genre *Trigonostemon* . . . . . 118
FIGURE 98 : Répartition de l'espèce *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 119
FIGURE 99 : Fleurs de différentes espèces du genre *Trigonostemon* . . . . . 120
FIGURE 100 : Différentes parties de *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 121
FIGURE 101 : Planche botanique de l'espèce *Trigonostemon cherrieri* . . . . 122
FIGURE 102 : Le squelette daphnane et la numérotation conventionnelle. En gras, les unités isoprènes. . . . . 125
FIGURE 103 : Trigohownine I (**71**) . . . . . 126
FIGURE 104 : Trigochinine A (**72**) . . . . . 126
FIGURE 105 : Trigonothyrine F (**73**) . . . . . 127
FIGURE 106 : Trigonosine A (**74**) . . . . . 127
FIGURE 107 : Trigoxyphine D (**75**) . . . . . 127
FIGURE 108 : Trigochinine C (**76**) . . . . . 127
FIGURE 109 : Trigonothyrine A (**77**) . . . . . 128
FIGURE 110 : Trigonothyrines B et C (**78** et **79**) . . . . . 128
FIGURE 111 : Rediocide A (**80**) . . . . . 128
FIGURE 112 : Trigochilide A (**81**) . . . . . 128
FIGURE 113 : Daphnetoxine (**82**) . . . . . 132
FIGURE 114 : Mézéréine (**83**) . . . . . 132
FIGURE 115 : Gnidimacrine (**84**) . . . . . 133
FIGURE 116 : Resiniferatoxine (**85**) . . . . . 133
FIGURE 117 : Genkwanine A (**86**) . . . . . 133
FIGURE 118 : Rediocide G (**87**) . . . . . 133
FIGURE 119 : Phragmaline (**88**) . . . . . 134
FIGURE 120 : Utiline (**89**) . . . . . 134

## LISTE DES FIGURES


FIGURE 121 : Xyloccensine S (**90**) . . . . . 134
FIGURE 122 : Tabularisine A (**91**) . . . . . 134
FIGURE 123 : Substitutions des limonoïdes orthoesters . . . . . 134
FIGURE 124 : Bryotoxine B (**92**) . . . . . 135
FIGURE 125 : Pétuniastérone N (**93**) . . . . . 135
FIGURE 126 : Orthoester de type pregnane de *Dregea sinensis* (**94**) . . . . . 135
FIGURE 127 : RTX (**85**), 2-iodo-RTX (**97**) et 5-bromo,4-amino-RTX (**98**) . . 137
FIGURE 128 : Motif vanillyle (**95**) commun des vanilloïdes . . . . . 137
FIGURE 129 : Capsaïcine (**96**) . . . . . 137
FIGURE 130 : RSA des DDO comme agents cytotoxiques. En vert, les modifications structurales autorisées, en rouge, les modifications structurales conduisant à une perte d'activité. . . . . 138
FIGURE 131 : DDO naturels accessibles par la voie de synthèse développée par Wender . . . . . 139
FIGURE 132 : Yuanhuapine ($\alpha$-époxyde) (**99**) et le stéréoisomère synthétique ($\beta$-époxyde) (**100**) . . . . . 139
FIGURE 133 : Prostratine (**101**) . . . . . 140
FIGURE 134 : DPP (**102**) . . . . . 140
FIGURE 135 : Gnidimacrine (**84**) . . . . . 141
FIGURE 136 : Stelleralide A (**103**) . . . . . 141
FIGURE 137 : Composés organohalogénés bioactifs . . . . . 143
FIGURE 138 : Diterpènes halogénés d'origine terrestre . . . . . 144
FIGURE 139 : Cofacteurs rédox des halogénases connues . . . . . 146

FIGURE 140 : Fractionnement standard des écorces de *Trigonostemon cherrieri* 151
FIGURE 141 : Schéma du principe du fractionnement RMN et CLHP-MS guidé 153
FIGURE 142 : Lichens sur le tronc de *T. cherrieri* . . . . . 154
FIGURE 143 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie I . . . . . 156
FIGURE 144 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie II . . . . . 157
FIGURE 145 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt du bois de cœur *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 158

FIGURE 146 : Trigocherrine A (**112**) . . . . . 163
FIGURE 147 : Spectre RMN $^{1}$H de la trigocherrine A (**112**) (600 MHz, $CDCl_3$) 164
FIGURE 148 : Spectre RMN $^{13}$C de la trigocherrine A (**112**) (150 MHz, $CDCl_3$) 164
FIGURE 149 : Principales corrélations HMBC du composé **112** . . . . . 166
FIGURE 150 : Motifs de substitutions des chlores répondant aux contraintes HMBC observées pour la trigocherrine A (**112**) . . . . . 167
FIGURE 151 : Principales corrélations ROESY du composé **112** . . . . . 168
FIGURE 152 : Trigocherrine B (**113**) . . . . . 169
FIGURE 153 : Principales corrélations HMBC de la trigocherrine B (**113**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**) 170
FIGURE 154 : Principales corrélations NOESY de la trigocherrine B (**113**) . . 171
FIGURE 155 : Trigocherrine C (**114**) . . . . . 172
FIGURE 156 : Principales corrélations COSY (en gras), HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**) et NOESY (en rouge) de la trigocherrine C (**114**) . . . . . 173
FIGURE 157 : Trigocherrine D (**115**) . . . . . 175
FIGURE 158 : Principales corrélations HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**) du composé **115** . . . 176
FIGURE 159 : Trigocherrine E (**116**) . . . . . 178
FIGURE 160 : Principales corrélations HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**) du composé **116** . . . 179
FIGURE 161 : Trigocherrine F (**117**) . . . . . 181
FIGURE 162 : Principales corrélations HMBC de la trigocherrine F (**117**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**) 182
FIGURE 163 : Trigocherriolide A (**118**) . . . . . 184
FIGURE 164 : Spectre RMN $^{1}$H du trigocherriolide A (**118**) (600 MHz, $CDCl_3$) 185
FIGURE 165 : Spectre RMN $^{13}$C du trigocherriolide A (**118**) (150 MHz, $CDCl_3$) 185
FIGURE 166 : Constante de couplage $^{1}J_{C-H}$ observée entre H-19 et C-19 (spectre HMBC du composé **118**) . . . . . 187
FIGURE 167 : Principales corrélations HMBC du trigocherriolide A (**118**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**) 188

FIGURE 168 : Principales corrélations NOESY du squelette diterpénique du composé **118**. En grisé, les corrélations communes au composé **112** . . . . . 190
FIGURE 169 : Principales corrélations NOESY de la partie macrocylique du composé **118** . . . . . 190
FIGURE 170 : Trigocherriolide B (**119**) . . . . . 192
FIGURE 171 : Principales corrélations HMBC du composé **119** (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **118**) . . . 193
FIGURE 172 : Principales corrélations NOESY de la partie macrocylique du composé **119** . . . . . 194
FIGURE 173 : Trigocherriolide C (**120**) . . . . . 196
FIGURE 174 : Trigocherriolide D (**121**) . . . . . 197
FIGURE 175 : Géométrie de la trigocherrine A (**112**) optimisée *ab initio* . . . 200
FIGURE 176 : Courbes de DC expérimentale et simulée pour la trigocherrine A (**112**) . . . . . 201
FIGURE 177 : Cycle catalytique supposé des halogénases $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante . . . . . 203
FIGURE 178 : Formation du motif chlorovinyle des jamaicamides via *Jam E* . 204
FIGURE 179 : Chlorations multiples catalysées par *CytC3* . . . . . 204
FIGURE 180 : Formes du cycle A chez l'ensemble des DDO . . . . . 205
FIGURE 181 : Motifs de chloration retrouvés chez les DDO halogénés de *T. cherrieri* . . . . . 205
FIGURE 182 : DDO non chloré, isolé de l'écorce de *T. cherrieri* . . . . . 205
FIGURE 183 : Mécanisme hypothétique de formation du motif chloro et dichlorovinyle $\alpha,\beta$-insaturé des DDO halogénés isolés de *T. cherrieri* . . . . . 206
FIGURE 184 : Acide $\alpha$-linolénique (**123**) . . . . . 209
FIGURE 185 : Superposition des spectres $^1$H de l'acide $\alpha$-linolénique isolé de *Trigonostemon cherrieri* (en noir), de l'acide $\alpha$-linolénique commercial (en vert), d'un agrandissement du spectre de l'acide $\alpha$-linolénique de *T. cherrieri* permettant de voir les composés minoritaires (en rouge) et de la trigocherrine B (**113**) (en bleu). 209

**Partie Expérimentale** **223**

FIGURE 186 : Schéma d'extraction des composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea* . . . . . 231
FIGURE 187 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie I . . . . . 234
FIGURE 188 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie II . . . . . 235
FIGURE 189 : Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt du bois de cœur *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 236

**Annexes** **291**

FIGURE 190 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone A (**49** ) (300 MHz, $CD_3OD$) . . 292
FIGURE 191 : Spectre $^{13}C$ et DEPT-135 de la chartacéone A (**49**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 292
FIGURE 192 : Spectre COSY de la chartacéone A (**49**) (300 MHz, $CD_3OD$) . 293
FIGURE 193 : Spectre HSQC de la chartacéone A (**49**) (300 MHz, $CD_3OD$) . 293
FIGURE 194 : Spectre HMBC de la chartacéone A (**49**) (600 MHz, $CDCl_3$) . 294

FIGURE 195 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone B (**50**) (300 MHz, $CD_3OD$) . . . 296
FIGURE 196 : Spectre $^{13}C$ et DEPT-135 de la chartacéone B (**50**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 296
FIGURE 197 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone C (**51**) (300 MHz, $CD_3OD$) . . . 297
FIGURE 198 : Spectre $^{13}C$ et DEPT-135 de la chartacéone C (**51**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 297
FIGURE 199 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone D (**52**) (300 MHz, $CD_3OD$) . . . 298
FIGURE 200 : Spectre $^{13}C$ et DEPT-135 de la chartacéone D (**52**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 298
FIGURE 201 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone E (**53**) (300 MHz, $CD_3OD$) . . . 299
FIGURE 202 : Spectre $^{13}C$ et DEPT-135 de la chartacéone E (**53**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 299
FIGURE 203 : Spectre $^{1}H$ de la chartacéone F (**54**) (300 MHz, $CD_3OD$) . . . 300

FIGURE 204 : Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone F (**54**) (75 MHz, $CD_3OD$) . . . . . 300

FIGURE 205 : Spectre HMBC de la chartacéone D (**52**) (600 MHz, *d*-DMF) . 302
FIGURE 206 : Spectre HMBC de la chartacéone E (**53**) (600 MHz, *d*-DMF) . 303

FIGURE 207 : Spectre $^1$H de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$) . . . 312
FIGURE 208 : Spectre $^{13}$C de la trigocherrine A **112** (150 MHz, $CDCl_3$) . . . 313
FIGURE 209 : Spectre HSQC de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$) . 314
FIGURE 210 : Spectre HMBC de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$) . 315
FIGURE 211 : Spectre NOESY de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$) 316
FIGURE 212 : Spectre ROESY de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$) 317

FIGURE 213 : Spectre $^1$H du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$) . . . 320
FIGURE 214 : Spectre $^{13}$C du trigocherriolide A **118** (150 MHz, $CDCl_3$) . . . 321
FIGURE 215 : Spectre HSQC du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$) . 322
FIGURE 216 : Spectre HMBC du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$) . 323
FIGURE 217 : Spectre ROESY du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$) 324

FIGURE 218 : Spectre $^1$H de la trigocherrine B (**113**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 326
FIGURE 219 : Spectre $^1$H de la trigocherrine C (**114**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 327
FIGURE 220 : Spectre $^1$H de la trigocherrine D (**115**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 328
FIGURE 221 : Spectre $^1$H de la trigocherrine E (**116**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 329
FIGURE 222 : Spectre $^1$H de la trigocherrine F (**117**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 330
FIGURE 223 : Spectre $^1$H du trigocherriolide B (**119**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 331
FIGURE 224 : Spectre $^1$H du trigocherriolide C (**120**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 332
FIGURE 225 : Spectre $^1$H du trigocherriolide D (**121**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . 333

**Publications** **343**

# Liste des Tableaux

**Partie Introductive** **9**

Tableau 1 : Espèces néo-calédoniennes présentant un % d'inhibition > à 70 % à 10 µg mL$^{-1}$ lors du criblage sur la NS5 polymérase du DENV 50

***Cryptocarya chartacea* : Étude chimique et activités biologiques** **57**

Tableau 2 : Activités biologiques de quelques alcaloïdes présents dans le genre *Cryptocarya* . . . . . 70
Tableau 3 : Activités biologiques de quelques $\alpha$-pyrones de *Cryptocarya* . . . 72
Tableau 4 : Activités biologiques de quelques flavonoïdes de *Cryptocarya* . . 77

Tableau 5 : Données RMN de la pinocembrine (**48**) et de la chartacéone A (**49**) ($CD_3OD$, 300 MHz) . . . . . 87
Tableau 6 : Configuration du centre chiral en C-2 des chartacéones A1-A4 (**55-58**) . . . . . 94
Tableau 7 : Configuration du centre chiral en C-2 des chartacéones B1-B4 (**59-62**) . . . . . 101
Tableau 8 : Activité inhibitrice des composés isolés de *Cryptocarya chartacea* vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV et cytotoxicité . . . . 103
Tableau 9 : Sélectivité des chartacéones vis-à-vis de plusieurs ARN-polymérases virales . . . . . 105

***Trigonostemon cherrieri* : Étude chimique et activités biologiques** **111**

Tableau 10 : Activités biologiques des composés isolés du genre *Trigonostemon* 130

Tableau 11 : Activités biologiques de la yuanhuapine (**99**) et de son stéréoisomère synthétique (**100**) . . . . . 139
Tableau 12 : Systèmes enzymatiques catalysant des halogénations et leurs caractéristiques . . . . . 146

Tableau 13 : Rendements d'extraction des composés isolés de *Trigonostemon cherrieri* . . . . . 159
Tableau 14 : Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C de la trigocherrine A (**112**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . . . . 165
Tableau 15 : Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C du trigocherriolide A (**118**) (600 MHz, $CDCl_3$) . . . . . 186
Tableau 16 : Activité inhibitrice de la NS5 polymérase du DENV de la trigocherrine A (**112**) et des trigocherriolides A (**118**) et B (**119**) . . 208
Tableau 17 : Activité inhibitrice des trigocherrines et trigocherriolides sur le CHIKV *in cellulo* . . . . . 211

**Partie Expérimentale** **223**

Tableau 18 : Références utilisées pour les déplacements chimiques . . . . . 226

**Annexes** **291**

Tableau 19 : Données RMN $^{1}$H des chartacéones A1-A4 (**55-58**) et B-F (**50-54**)304

Tableau 20 : Données RMN $^{13}$C des chartacéones A1-A4 (**55-58**) et B-F (**50-54**)306

Tableau 21 : Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C des trigocherrines de *Trigonostemon cherrieri* (600 MHz, $CDCl_3$) . . . . . 334

Tableau 22 : Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C des trigocherriolides de *Trigonostemon cherrieri* (150 MHz, $CDCl_3$) . . . . . 336

**Publications** **343**

# Liste des Abréviations

**ACN** Acétonitrile

**CC** Chromatographie sur Colonne

**$CC_{50}$** Concentration nécessaire à 50 % de cytotoxicité

**CCM** Chromatographie sur Couche Mince

**$CDCl_3$** Chloroforme deutéré

**CHIKV** Virus du chikungunya

**$CI_{50}$** Concentration nécessaire à 50 % d'inhibition

**CLHP** Chromatographie Liquide Haute Performance

**CLHP-MS** Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse

**CMI** Concentration Minimale Inhibitrice

**COSY** COrelated SpectroscopY

**DC** Dichroïsme circulaire

**DD** Diterpénoïde Daphnane

**DDO** Diterpénoïde Daphnane Orthoester

**DDOM** Diterpénoïde Daphnane Orthoester Macrocyclique

**DEDL** DEtecteur à Diffusion de Lumière

**DENV** Virus de la dengue

**DEPT-135** Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**DMEM** Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium, milieu de culture cellulaire

**DMSO** Diméthylsulfoxide

**EC** Effet Cotton

**EDTA** Acide Éthylène Diamine Tétracétique

**EtOH** Éthanol

**HCV** Virus de l'Hépatite C

**HMBC** Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HMQC** Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**HSQC** Heteronuclear Single Quantum Coherence

**IPA** Isopropanol

**IS** Indice de sélectivité

**KB** Lignée cellulaire cancéreuse de nasopharynx

**MeOH** Méthanol

**MRC-5** Lignée cellulaire saine de fibroblastes diploïdes de poumons foetaux humains

**MTS** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

**ND** Non Déterminé

**NOESY** Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

**PKC** Protéine Kinase C

**RMN** Résonance Magnétique Nucléaire

**ROESY** Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY

**RSA** Relations Structure-Activité

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**RTX** Résinifératoxine

**SFC** Supercritical Fluid Chromatography

**SM** Spectrométrie de Masse

**TDDFT** Time Dependant Functional Density Theory

**TRPV1** Transcient Receptor Potential Vanilloid de type 1

**UV** Ultra-Violet

**VIH** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**WNV** West-Nile Virus

# Introduction générale

L'Homme a su depuis longtemps tirer parti des ressources naturelles afin d'assurer le développement de son espèce. Tout au long de son évolution, l'espèce humaine a trouvé dans son environnement immédiat les ressources nécessaires à son alimentation, à la construction de son habitat et a également su intégrer le potentiel de guérison des plantes médicinales puis des substances naturelles qu'elles synthétisaient. Fruit d'une étroite et longue cohabitation entre l'humain et le monde végétal, la connaissance des substances naturelles et de leurs effets thérapeutiques s'est acquise empiriquement. La première forme d'écriture, le cunéiforme, a servi à la description des plantes médicinales et de leurs vertus. Ces tablettes d'argiles furent retrouvées en Mésopotamie près de 2600 ans av. J.C. Par la suite de nombreux textes ont permis de fixer ce savoir dans le temps. Ainsi le *Shennong Bencao Jing* (Classique de la Matière Médicale Chinoise) écrit entre 200 et 1100 av. J.C., le papyrus d'Ebers ou encore les hymnes ayurvédiques du *Rig Veda* documentent tous de nombreuses utilisations de plantes médicinales.[1]

L'emploi de plantes médicinales entières, seules ou en mélange, sous diverses formes est étroitement lié à la médecine que l'on qualifie de *traditionnelle*. La médecine traditionnelle a été la médecine de l'humanité pour des millénaires et continue de l'être pour 80 % de la population mondiale.[2]

Il y a environ 200 ans, Friedrich Sertümer isole le premier composé pur et pharmacologiquement actif d'une plante : la morphine, du latex de *Papaver somniferum*. Un paradigme s'opère alors : il est désormais possible de purifier, de caractériser, de doser et d'étudier les substances responsables de l'activité biologique d'une plante. La pharmacologie prend son essor, et, par la suite, de nombreuses substances actives sont découvertes et caractérisées. On pourra donner l'exemple de l'aspirine dérivée de la salicyline isolée du Saule blanc (*Salix alba*), de la quinine, un alcaloïde antipaludique isolé des écorces de *Cinchona* spp. ou encore de la digitaline, un glycoside cardiotonique extrait de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*). Au cours du siècle dernier, la recherche pharmaceutique continue de progresser et, actuellement, environ 50 % des médicaments commercialisés sont soit des produits naturels, soit des dérivés synthétiques inspirés de produits naturels. Des antibiotiques (pénicilline, tétracycline ...), des antipaludiques (artémisinine), des hypolipidémiants (lovastatine), des immunosuppresseurs (cyclosporines) ou encore des agents anticancéreux (taxol, vinblastine, épipodophyllotoxine ...)

1. Spainhour, C. B., *Drug Discovery Handbook*; John Wiley & Sons Inc. : 2005, p. 11–63.
2. WHO *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*, rap. tech., Geneva : WHO, 2002.

sont isolés de bactéries, de champignons ou de végétaux supérieurs et sont des outils thérapeutiques majeurs de notre époque.

Malgré ces exemples, dans les dernières décennies, la plupart des firmes pharmaceutiques se sont désintéressées de l'exploration et de la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle. L'engouement pour la chimie médicinale de synthèse, et particulièrement la chimie combinatoire, dans les années 1990, est une des raisons de cette perte d'intérêt vis-à-vis des produits naturels. La chimie combinatoire permettant de synthétiser de manière aléatoire et rapide un très grand nombre de composés, l'idée était de créer des chimiothèques de plusieurs millions de composés synthétiques. En maximisant le nombre de composés dans les chimiothèques, le nombre de « hits » augmenterait, statistiquement. Mais les espoirs fondés par l'industrie pharmaceutique dans ces gigantesques chimiothèques synthétiques se sont confrontés à un taux de hits très faible par rapport aux produits naturels. A titre d'exemple, on peut comparer les quelques 7 000 polykétides connus pour lesquels une vingtaine (0,3 %) ont été commercialisés à ce jour, ce qui est largement supérieur au taux de hits moyen ($< 0,001\%$) des chimiothèques de l'industrie pharmaceutique.[3]

En fait, il est vraisemblable que les produits naturels représentent des structures privilégiées pour la découverte de molécules bioactives. En effet, il existe un nombre limité de repliements protéiques connus, et les produits naturels, lors de leurs synthèse ou pour remplir leur fonction biologique dans l'organisme d'origine, se lient à ces protéines. On pourrait y voir une sorte de « validation biologique » de ces composés expliquant des activités biologiques plus nombreuses pour ces structures favorables à la liaison avec des enzymes ou des récepteurs protéiques.

Cependant le criblage de produits naturels présente de nombreuses difficultés. On relèvera ainsi les problèmes liés à l'approvisionnement des matières premières, notamment dans le cas des organismes marins et des végétaux supérieurs ou encore les variabilités saisonnières ou géographiques de la composition chimique de ces organismes. Les sources de produits naturels peuvent également se faire rares voire disparaître, ainsi près de 15 000 des 50 à 70 000 plantes médicinales connues seraient en danger d'extinction.[4] Ensuite, quand la ressource première est accessible, les extraits bruts initiaux sont bien souvent constitués de mixtures complexes de structures très diverses parmi lesquelles

3. Weissman, K. J. ; Leadlay, P. F. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3* 925–36.
4. Brower, V. *J. Natl. Cancer I.*, **2008**, *100* 838–9.

les composés actifs peuvent être très minoritaires, faiblement solubles ou encore instables. D'autre part, une activité biologique peut-être observée par synergie entre deux ou plusieurs composés et celle-ci sera perdue après l'isolement des produits. Enfin, la purification et la caractérisation de produits naturels est une opération qui demande du temps et un travail considérable.

Ensemble, ces caractéristiques et contraintes du travail avec les produits naturels sont incompatibles avec les impératifs d'efficacité et de rentabilité de l'industrie pharmaceutique et expliquent, en partie, le désintérêt de la recherche privée pour cette source de diversité chimique.

Les grands groupes de cette industrie qui obtiennent la quasi-totalité de leur chiffre d'affaire d'un petit nombre de molécules appelés « blockbusters », sont en crise. Dans les 3 ou 4 prochaines années, un grand nombre de ces molécules phares tomberont dans le domaine public conduisant à des baisses faramineuses du chiffre d'affaire de ces multinationales pharmaceutiques.[5] C'est la pression économique extrême dans cette industrie qui oriente les axes de recherche et elle implique que ces entreprises atteignent leurs objectifs de façon précise, rapide et surtout profitable.

Les produits naturels, peu adaptés au criblage à haut débit pour les raisons évoquées plus haut n'ont donc pas la faveur de l'industrie pharmaceutique dans leurs processus de recherche de substances bioactives. D'autre part, de la même façon que cette industrie sélectionne ses sources de nouveautés chimiques sur des critères économiques, les cibles biologiques visées sont également choisies dans un objectif de rentabilité. Ainsi, les maladies infectieuses et les courtes durées de traitements des antibiotiques associés sont des cibles moins intéressantes que les maladies cardiovasculaires ou les hypercholestérolémies pour lesquelles les traitements, symptomatiques et non-curatifs, sont prescrits de façon journalière et prolongée.

De fait, les viroses émergentes comme la dengue ne sont pas le cheval de bataille de l'industrie pharmaceutique et la faible solvabilité des pays concernés par ces viroses est, sans aucun doute, une raison majeure de ce désintérêt. Et pourtant, avec près de 40 % de la population mondiale habitant en zone à risque, 50 à 100 millions d'infections annuelles et une épidémiologie inquiétante, cette affection est loin d'être négligeable.[6]

5. Goodman, M. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, *8* 927–8.
6. Guzman, M. G. et al. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2010**, *8* S7–S16.

L'aire géographique de répartition du virus est en constante expansion et il n'existe actuellement aucun vaccin commercialisé ni thérapie antivirale efficace.[7]

La recherche d'antiviraux au sein de la biodiversité tropicale apparaît donc comme un sujet d'intérêt et est pleinement justifié au sein d'un institut de recherche académique. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette voie de recherche.

Suite à un criblage d'extraits de diverses parties de plantes néo-calédoniennes sur la NS5 polymérase du virus de la dengue (DENV) réalisé en collaboration avec l'équipe de biologie structurale de l'AFMB de Marseille, nous avons sélectionné deux plantes pour cette étude : *Cryptocarya chartacea* (Lauraceae) et *Trigonostemon cherrieri* (Euphorbiaceae).

Ce manuscrit est constitué de quatre parties. La partie introductive aura pour but de définir le cadre de cette étude en présentant la *source* (la biodiversité néo-calédonienne) et la *cible* (le virus de la dengue) des molécules isolées au cours de mes travaux de thèse. Les parties 2 et 3 seront consacrées aux travaux phytochimiques entrepris sur *Cryptocarya chartacea* et *Trigonostemon cherrieri*. Dans chaque partie, un chapitre ayant pour objet l'étude bibliographique du genre et de certains métabolites d'intérêt précédera le chapitre concernant l'étude phytochimique et les résultats biologiques obtenus. Une conclusion générale synthétisera l'ensemble des résultats obtenus. Enfin, la partie expérimentale décrira l'ensemble des matériels et méthodes employés durant ces travaux de thèse.

7. Coller, B.-A. G. ; Clements, D. E. *Curr. Opin. Immunol.*, **2011**, *23* 1–8.

# Première partie

# Partie Introductive

Cette partie introductive s'attachera à décrire le contexte général de la thèse de façon à apporter au lecteur les informations nécessaires à une bonne compréhension du sujet.

La biodiversité néo-calédonienne comme source de molécules bioactives fera l'objet du premier chapitre. Ce chapitre sera traité en prenant comme fil conducteur le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa. L'historique et les raisons de la création de cette antenne CNRS particulière ainsi qu'une sélection d'exemples des résultats scientifiques obtenus seront décrits.

Le second chapitre présentera dans un premier temps la dengue comme maladie infectieuse tropicale avec son épidémiologie et sa répartition mondiale actuelle. Dans un deuxième temps, l'agent causal, le virus de la dengue, y sera décrit du point de vue structural. Le rôle des différentes protéines constitutives du virus, leur intérêt comme cibles thérapeutiques et le potentiel des molécules inhibitrices découvertes jusque maintenant seront discutés.

# Chapitre 1

# Le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa

**Plan**


1.1 Situation géographique et historique . . . . . **11**
1.2 Axes de recherche et résultats . . . . . **14**
1.2.1 Période 1967-1985 . . . . . 14
1.2.2 Période 1986-actuelle . . . . . 18
1.3 Bilan et situation actuelle . . . . . **20**


## 1.1 Situation géographique et historique

Située dans l'océan Pacifique, à 1500 km des côtes australiennes, la Nouvelle-Calédonie est une île montagneuse de 400 km de long sur 50 km de large. Ancien Territoire d'Outre-Mer (TOM), la Nouvelle-Calédonie est désormais un Pays d'Outre-Mer (POM), une collectivité *sui generis* (de son propre genre) qui relève de la souveraineté française.

En 1774, l'explorateur anglais James Cook « découvre » l'archipel qu'il baptise *New-Caledonia*. Cependant il n'est pas le premier à mettre le pied sur cette terre et les mélanésiens auraient peuplé l'île il y a plus de 3000 ans. Dès le XVIII$^{e}$ siècle la végétation locale a été l'objet d'études. Forster (1786), qui accompagnait Cook, fut le premier botaniste à décrire la flore néo-calédonienne. En 1824, Labillardière rédige le premier ouvrage entièrement consacré à la botanique de l'île. Par la suite, Montrouzier (1860), Vieillard et Deplanche (1863), Balansa (1873), Schlechter (1905) ou encore Baker, Rendle et Moore (1921) herboriseront largement le territoire néo-calédonien. Au cours du XX$^{e}$

siècle, Guillaumin, chargé des herbiers néo-calédoniens au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris depuis 1909, produira la première « Flore analytique et synoptique de Nouvelle-Calédonie ». Enfin, plus récemment, MacKee, Veillon, Jaffré et Morat contribuèrent largement à la connaissance botanique de la flore de l'île.[8]

**Endémisme et « unités de végétation ».** Si tant de botanistes se sont intéressés aux végétaux de Nouvelle-Calédonie, c'est sans aucun doute pour la richesse et la particularité de sa flore. En effet, sur les 3200 espèces de plantes vasculaires recensées en Nouvelle-Calédonie, on observe près de 75 % d'endémisme spécifique. Cette endémicité spécifique forte se double d'un haut degré d'endémicité aux niveaux plus élevés de la classification avec 104 genres et 5 familles strictement endémiques.[8]

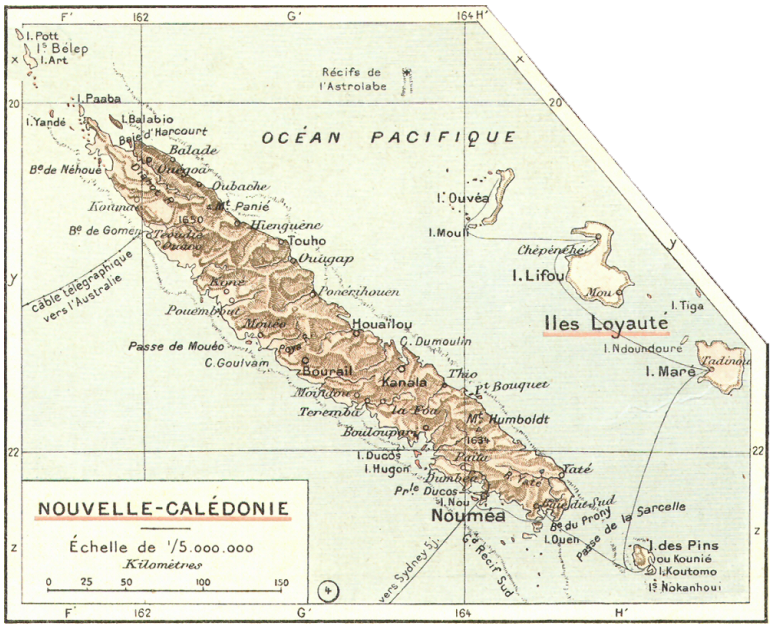



**Figure 1. Carte de la Nouvelle-Calédonie** - atlas classique Vidal Lablache (1910)

Ce fort endémisme s'explique par l'insularité de la Nouvelle-Calédonie et la variété des sous-sols que l'on peut globalement classer en trois catégories[9] :

- les sols à schistes et micaschistes (Nord-Est de l'île)

8. Jaffré, T. et al., *Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-Calédonie* ; IRD : 2001.

9. Sévenet, T. ; Potier, P. dans *Substances naturelles d'intérêt biologique du Pacifique*, Nouméa, 1979.

- les sols calcaires récents (Iles Loyautés) ou anciens (région de Hienghène)
- les sols ultrabasiques à péridotites (les terres rouges, les terrains miniers du Sud et les massifs de la côte Ouest et du Nord)

L'histoire géologique de l'archipel associée aux facteurs climatiques et aux activités humaines ont conduit à une végétation très diverse que l'on peut regrouper en « unités de végétation ».[8] On distinguera ainsi :

- la forêt dense humide sempervirente
- la forêt sclérophylle
- le maquis
- la végétation des zones humides (zones marécageuses, zones inondées)
- la savane
- les formations halophiles (mangroves et végétation littorale des plages)
- les fourrés secondaires et la végétation rudérale

**La naissance du Laboratoire des Plantes Médicinales.** C'est au sein de ce biotope exceptionnel que se trouve le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa. Initialement, l'idée de la création de cette antenne CNRS particulière fut celle du professeur Maurice-Marie Janot, le premier directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette. En 1964, le professeur Roger Heim, grand mycologue français et directeur du MNHN est l'instigateur d'un colloque « Phytochimie et Plantes Médicinales du Pacifique » en Nouvelle-Calédonie. Maurice-Marie Janot, présent à ce colloque, voit tout de suite un grand intérêt à explorer le potentiel phytochimique de la flore de l'île. En 1967, Thierry Sévenet est dépêché par M.-M. Janot et Pierre Potier pour une première mission de collecte de plantes. En 1970, Jean-Philippe Jeanniot effectue une seconde mission. Ces premières missions ayant conduit à des résultats très encourageants, le Territoire de Nouvelle-Calédonie et la Chambre d'Agriculture attribuent au CNRS, en 1971, une subvention qui va permettre la construction d'un laboratoire, sur place, dans le parc forestier de Montravel : le Laboratoire des Plantes Médicinales. Voir Photo 2.[10]

10. Sévenet, T. et al. *Etudes sur les plantes médicinales de Nouvelle-Calédonie*, rap. tech., 1991, p. 71.

**Figure 2.** Le Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa[10]

En 1972, Thierry Sévenet y est en affectation permanente pour 8 ans. Puis se succèdent J. et M. Pusset de 1977 à 1985, G. Chauvière de 1980 à 1984, S. Labarre de 1986 à 1990, J.P. Cosson de 1988 à 1993, Marc Litaudon de 1994 à 2001, Vincent Dumontet de 2001 à 2006 et Cyril Poullain de 2006 à aujourd'hui.

## 1.2 Axes de recherche et résultats

### 1.2.1 Période 1967-1985

A l'origine, deux grands programmes de recherche sont définis pour le Laboratoire des Plantes Médicinales :

- l'étude des substances naturelles de la flore de l'île et des archipels voisins
- l'étude des substances naturelles des invertébrés marins du lagon calédonien [a]

Mais l'étude phytochimique de la flore calédonienne est restée l'axe de recherche principal du Laboratoire des Plantes Médicinales de Montravel. Au départ deux approches étaient envisagées :

a. Ce dernier programme est mené conjointement avec l'ORSTOM (Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer), maintenant IRD (Institut pour la Recherche et le Développement)

**L'approche ethnopharmacologique :** des enquêtes de terrains répertorient les remèdes traditionnels employés par les populations locales, permettant ainsi d'orienter la collecte des plantes.

Les mélanésiens possèdent une grande connaissance des vertus curatives des plantes locales, et les plantes sont la base de leur pharmacopée traditionnelle. Cependant, dès 1979, Thierry Sévenet soulignait que les habitants de Nouvelle-Calédonie ne partageaient pas facilement leurs secrets de peur de diminuer les vertus des plantes employées.[9] Si cette approche à été envisagée, et des enquêtes de terrain effectuées (notamment par Dominique Bourret puis Pierre Cabalion, des chercheurs de l'IRD), elle n'aura clairement pas été le principal angle d'approche lors de la sélection des plantes à étudier en Nouvelle-Calédonie.

**L'approche chimiotaxonomique :** elle consiste à orienter la recherche des plantes en fonction de leurs appartenance botanique et contenu chimique. Ainsi, on récoltera des Apocynaceae ou des Rubiacaeae pour leur contenu alcaloïdique, ou encore des plantes de la famille des Simaroubaceae si l'on s'intéresse aux quassinoïdes.

Cette seconde approche a été privilégiée dès le début par le Laboratoire des Plantes Médicinales avec une focalisation toute particulière pour les plantes à alcaloïdes. En effet les alcaloïdes sont souvent doués de propriétés biologiques variées. En outre, l'ICSN était à l'époque spécialisé dans l'étude de cette classe de composés, notamment issus d'espèces du genre *Ochrosia* qui produisent l'ellipticine. Ce dernier, isolé originellement d'*Ochrosia borbonica*[11] est doté d'une puissante activité antitumorale. L'obtention d"analogues de l'ellipticine fut l'une des premières raisons des missions de collecte en Nouvelle-Calédonie.

Les première années, les récoltes de plantes furent donc exclusivement orientées vers la recherche d'alcaloïdes. Ainsi, dans un premier rapport d'activité publié en 1979, après presque 10 ans de travail en Nouvelle-Calédonie, Thierry Sévenet fait état de 849 plantes récoltées parmi lesquelles 167 présentaient un contenu alcaloïdique appréciable. 125 espèces étaient alors en cours d'étude.[12]

Voici quelques exemples extraits de ce rapport d'activité. Les alcaloïdes au squelette tropanique comme le composé **1** et la strobolamine (**2**) sont isolés respectivement de

11. Svoboda, G. H. et al. *J. Pharm. Sci.*, **1968**, *57* 1720–1725.
12. Sévenet, T. ; Potier, P. *Mission C.N.R.S. en Nouvelle-Calédonie 1967-1979*, rap. tech., 1979, p. 32.

*Knightia deplanchei*[13] et *Knightia strobilina*[14], deux Proteaceae calédoniennes. (Fig. 3) Les Proteaceae appartiennent à une famille archaïque du point de vue botanique et fort éloignée des Erythroxylaceae et autres Solanaceae chez lesquelles on trouve d'habitude ce type de squelette. Le fait de trouver ce type de métabolites dans des Protaceae est une curiosité chimiotaxonomique et peut apporter des informations quant aux relations phylogénétiques de ces familles.

**1** **2**

**Figure 3.** Alcaloïdes tropaniques isolés du genre *Knightia*

On peut citer également ces alcaloïdes issus de la condensation de spermine ou de spermidine avec l'acide cinnamique, pour l'homaline (**3**) (isolée de *Homalium* sp.[15]) et la périphylline (**4**) (isolée de *Peripterygia marginata*[16]) respectivement. (Fig. 4). L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une centaine de publications et d'une quinzaine de thèses de doctorat.[12]

**3** **4**

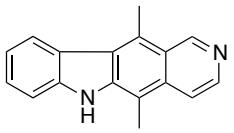
**Figure 4.** Homaline (**3**) et periphylline (**4**)

La méthodologie employée alors était la suivante : de petites quantités de plantes sont récoltées sur le terrain suivant les critères chimiotaxonomiques. Sur le terrain ou au laboratoire, des tests de dépistage (comme par exemple le test de Valser-Mayer pour la détection d'alcaloïdes) mettent en évidence l'intérêt éventuel d'une plante. Une

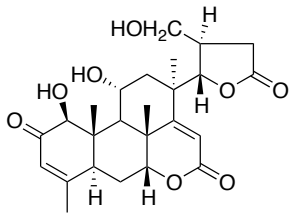
13. Kan-Fan, C ; Lounasmaa, M. *Acta Chem. Scand*, **1973**, *27* 1039–1052.
14. Lounasmaa, M et al. *Phytochemistry*, **1980**, *19* 953–955.
15. Païs, M et al. *Tetrahedron*, **1973**, *29* 1001–1010.
16. Leboeuf, M. et al. *Pl. Méd. et Phytothér.*, **1971**, *5* 126.

seconde tournée, permettant de récolter des stocks plus importants peut alors être organisée. Un extrait brut organique et un extrait aqueux lyophilisé sont préparés. Le premier est destiné à l'ICSN où les moyens d'étude phytochimique sont plus développés mais également à de nombreuses collaborations en France (à l'université de Paris V, de Chatenay-Malabry, de Reims, de Montpellier, de Strasbourg ...) ou encore à l'étranger (en Australie, en Angleterre, en Allemagne ou en Finlande). L'extrait lyophilisé sera destiné à l'évaluation des propriétés pharmacologiques de la plante par des laboratoires pharmaceutiques partenaires (Rhône-Poulenc, Roussel-Uclaf, Roger-Bellon, Delalande ...)

Les activités biologiques évaluées sont principalement les activités cytotoxiques, les activités sur le système cardio-vasculaire et les activités sur le système nerveux central. Du point de vue pharmacologique, l'étude des différentes espèces d'*Ochrosia* néocalédoniennes aura permis d'isoler des analogues de l'ellipticine (**5**) et d'approfondir l'étude des relations structure-activité de cet antitumoral.[17–19] Les tubulosines, alcaloïdes isolés de plantes de la famille des Alangiaceae ont également montré des activités oncostatiques sur diverses tumeurs expérimentales. Un autre résultat intéressant concerne l'activité anti-leucémique de quassinoïdes comme le soulaméolide (**6**) isolé du genre *Soulamea*.[20]




**5**




**6**

**Figure 5.** Ellipticine (**5**) et soulaméolide (**6**)

Du point de vue botanique, de nouvelles espèces ont été décrites : *Alstonia boulindaensis* Boiteau, *Ochrosia inventorum* L. Allorge, *Neisosperma sevenetii* Boiteau, *Goniothalamus dumontetii* R.M.K Sauders & Munzinger ...[21]

17. Cosson, J. P. ; Smid, M. *Phytochemistry*, **1970**, *9* 1353–1354.
18. Kan-Fan, C et al. *Phytochemistry*, **1970**, *9* 1351–1352.
19. Bruneton, J et al. *Phytochemistry*, **1972**, *11* 3073–3075.
20. Polonsky, J. et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979** 641.
21. Guéritte, F. et al. *Ethnopharmacologia*, **2010**, *45* 47–49.

### 1.2.2 Période 1986-actuelle

Dans son rapport d'activité de 1993, Thierry Sévenet souligne « *Si les recherches chimiques ont été très fécondes, on ne peut dire que le criblage biologique ait été satisfaisant pendant toute cette période (1967-1985)* ».[22]

**Changement de stratégie.** A partir de 1986, on assiste à un changement de stratégie : l'approche biologique est alors privilégiée dans la sélection de plantes. Des essais biologiques sont effectués localement (cytotoxicité dans les locaux du CNRS ou de l'ORSTOM, essais sur le virus de la dengue à l'Institut Pasteur de Nouméa) et en métropole (cytotoxicité et tubuline à l'ICSN, criblage général dans les laboratoires Rhône-Poulenc à Vitry).

Cette approche, focalisée en premier lieu sur l'activité biologique, débute en fait par une récolte *systématique* des plantes qui ne privilégie aucune famille. Elle requiert la récolte de spécimens identifiables (présence de fleurs et/ou de fruits) et de solides connaissances botaniques de la part du récolteur.

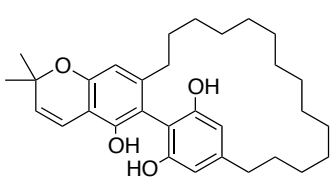
Finalement, des trois approches (ethnobotanique, chimiotaxonomique et systématique) employées avec plus ou moins de succès suivant les périodes au Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa, c'est la dernière, que l'on pourrait qualifier de *systématique-bioguidée* qui sera retenue au début des années 90 et qui est employée aujourd'hui.

Actuellement, un protocole standard d'extraction a été mis en place, et, pour chaque plante récoltée, 150 g de matériel végétal broyé sec sont soumis à une extraction sur extracteur automatique ASE 300 (Dionex) pour obtenir un extrait AcOEt et MeOH [1] qui seront par la suite filtrés sur cartouche de polyamide afin d'éliminer une grande partie des molécules trop polaires de type tannins, souvent responsables de faux positifs lors des essais biologiques. Ces extrait bruts sont ensuite mis en plaque 96 puits et constituent une partie de l'extractothèque de l'ICSN. A l'heure actuelle, l'extractothèque de l'ICSN est riche de près de 14 000 extraits provenant de près de 6400 plantes de diverses origines géographiques. Les criblages biologiques se font par la suite en fonction des collaborations de notre équipe.

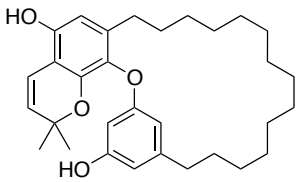
22. Sévenet, T. *Plantes médicinales et Substances marines, le point sur les recherches et le projet du CNRS*, rap. tech., 1993, p. 13.

1. Depuis 2005, seuls les extraits AcOEt filtrés sur polyamide sont évalués lors des premiers criblages.

**Quelques résultats récents.** Cette approche *systématique-bioguidée* a permis à l'ICSN de s'intéresser à des familles chimiques autres que celle des alcaloïdes mais surtout à des molécules présentant des activités biologiques intéressantes. Voici quelques exemples de molécules issues de plantes calédoniennes sélectionnées et étudiées après un criblage biologique. Ainsi la kermadécine A (**7**), un cyclophane de la famille des turrianes a été isolé de *Kermadecia elliptica* une Proteaceae étudiée pour son activité cytotoxique. Ce composé présente une cytotoxicité significative sur cellule KB.[23] Plus tard, le travail phytochimique de *Kermadecia rotundifolia* a montré la présence de kermadécines tel l'isokermadécine D (**8**) qui inhibe l'acétylcholine estérase (AChE) avec une $CI_{50}$ de l'ordre de 3 µM. La liaison éther semble nécessaire à l'activité inhibitrice de l'AChE.[24]




**7**



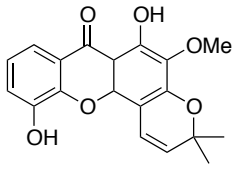

**8**

**Figure 6.** Turrianes isolés du genre *Kermadecia*

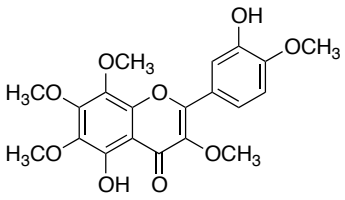
La caledonixanthone E (**9**) isolée de *Calophyllum caledonicum* a montré une $CMI_{80}$ de 8 µg mL$^{-1}$ sur *Aspergillus fumigatus*, soit une activité comparable à celle de la référence : l'amphotéricine B.[25] Un flavonoïde (**10**) a été isolé d'une Rutaceae néo-calédonienne, *Zieridium pseudobtusifolium* lors de la recherche d'inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline. La 5,3'-dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone (**10**) est cytotoxique sur KB (0.04 µg mL$^{-1}$) et inhibe l'assemblage de tubuline en microtubules (12 µM).[26]

En collaboration avec les Laboratoires Servier, un criblage visant à isoler des molécules ayant une utilité dans le traitement du diabète et de l'adipogénèse a été mené en recherchant des agonistes des hPPAR$\gamma$, un récepteur nucléaire impliqué dans les voies métaboliques régulant l'adipogénèse et la carcinogénèse. Ce criblage a permis de

23. Jolly, C. et al. *Phytochemistry*, **2008**, *69* 533–40.
24. Beniddir, M. A. et al. *Phytochem. Lett.*, **2010**, *3* 75–78.
25. Morel, C. et al. *Planta Med.*, **2002**, *68* 41–4.
26. Lichius, J. J. et al. *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57* 1012–1016.

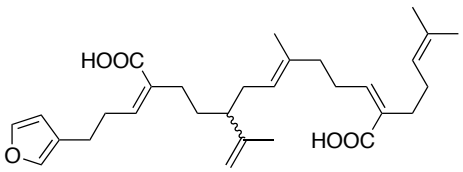



**9**

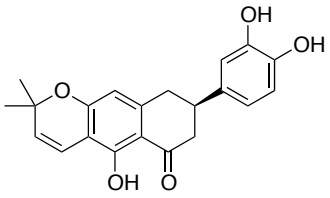



**10**

sélectionner des espèces du genre *Cupaniopsis* de la famille des Sapindaceae et des *Zygogynum* de la famille des Winteraceae. La cupaniopsine A (**11**) a été isolée de l'écorce de *Cupaniopsis trigonocarpa*. C'est la première fois qu'un furanotriterpène linéaire est isolé du monde végétal. La cupaniopsine A (**11**) possède un *Ki* de 15 nM vis-à-vis du récepteur hPPAR$\gamma$.[27] L'étude de plusieurs espèces de *Zygogynum* (*Z. spititatum*, *Z. acsmithii*, *Z. pancherii*, *Z. bailloni*) a permis de mettre en évidence la présence de phényltétralones au sein de toutes les espèces. Là encore, c'est la première fois que ces composés sont isolés de végétaux supérieurs. La zygolone A (**12**) présente une constante de liaison de l'ordre du micromolaire pour hPPAR$\gamma$.[28]




**11**




**12**

**Figure 7.** Ligands du récepteur hPPAR$\gamma$ isolés de plantes néo-calédoniennes.

## 1.3 Bilan et situation actuelle

Débutée il y a plus de 40 ans et concrétisée sur le terrain par la création du Laboratoire des Plantes Médicinales de Nouméa, la prospection phytochimique de la Nouvelle-Calédonie a été fructueuse.

Sur les quelques 3 700 espèces de plantes de l'île dont 2 500 sont endémiques, environ 1 500 ont été récoltées. D'abord axée sur la recherche d'alcaloïdes, la démarche a peu

27. Bousserouel, H. et al. *Tetrahedron*, **2005**, *61* 845–851.
28. Allouche, N. et al. *Phytochemistry*, **2008**, *69* 1750–5.

à peu évolué pour s'orienter vers une sélection bioguidée des espèces à étudier tout en faisant appel à une collecte systématique des plantes sur le terrain. Cette antenne locale du CNRS, les personnes qui y ont travaillé, les formations d'étudiants, les collaborations avec les organismes de recherche locaux (IRD, Université de Nouvelle-Calédonie) et métropolitains publics (MNHN, Universités régionales) et privés (laboratoires pharmaceutiques) ont permis, ensemble, de mieux connaître la flore néo-calédonienne et son potentiel thérapeutique. Aujourd'hui, il reste encore beaucoup de plantes locales à récolter et étudier chimiquement et biologiquement. D'autre part, le criblage sur de nouvelles cibles protéique ou cellulaires de l'extractothèque de l'ICSN constituée, en partie, par l'ensemble des plantes collectées au cours des 20 dernières années en Nouvelle-Calédonie pourrait révéler de bonnes surprises.

# 1. LE LABORATOIRE DES PLANTES MÉDICINALES DE NOUMÉA

# Chapitre 2

# Le virus de la dengue et l'intérêt de la NS5 polymérase comme cible thérapeutique

**Plan**


| | | | |
|---|---|---|---|
| 2.1 | La dengue : une maladie infectieuse (ré)émergente | | **24** |
| | 2.1.1 | Historique | 24 |
| | 2.1.2 | Épidémiologie et répartition actuelle | 26 |
| | 2.1.3 | Symptomatologie | 29 |
| 2.2 | Le virus de la dengue | | **33** |
| | 2.2.1 | Cycle de vie | 33 |
| | 2.2.2 | Protéines virales et cibles thérapeutiques | 36 |


**La dengue :** infection virale, endémique dans de nombreux pays de la zone intertropicale. La dengue est une arbovirose [1] transmise à l'Homme par la piqûre d'un moustique du genre *Aedes*, lui-même infecté par le virus de la dengue (DENV), famille des Flaviviridae. Les flambées épidémiques en constante augmentation depuis les années 50 conduisent a considérer la dengue comme une maladie infectieuse (ré)émergente.

1. Maladie virale due à un arbovirus. Les arbovirus (pour ARthropod-BOrne virus) sont des virus transmis par un arthropode, ici, un insecte.

## 2.1 La dengue : une maladie infectieuse (ré)émergente

### 2.1.1 Historique

L'origine du virus de la dengue (DENV) est sujet à controverse. Certains penchent pour une origine africaine de par l'origine même du vecteur principal de la dengue : *Aedes aegypti*.[29] Cependant des travaux plus récents montrant la faible susceptibilité de *Aedes aegypti formosus* (l'ancêtre africain d'*Aedes aegypti*) à l'infection par le DENV[30] et des analyses phylogénétiques[31] indiquent une origine asiatique du virus. Le DENV aurait d'abord évolué comme un virus au sein de moustiques arboricoles avant de s'adapter à des primates en zone forestière.[32] Le DENV serait par la suite sorti des zones forestières vers les environnement péri-domestiques au moment des développements d'habitats humains proche des zones sylvestres.[29]

L'origine du terme *dengue* est discutée. Elle pourrait venir de l'expression Swahili *« Ka denga pepo »* signifiant *« crampes causées par un esprit malin »* ou encore l'emploi du terme même *« dengue »* par la reine d'Espagne en 1801 pour décrire une maladie causant une fièvre aiguë accompagnée de douleurs articulaires et osseuses, et d'hémorragies.[33] Les premières traces écrites rapportant de possibles cas de dengue sont retrouvées dans une encyclopédie médicale chinoise de la dynastie Jin dans les années 200-400 ap. J.C.. Quelques siècles plus tard sont rapportées des épidémies d'une maladie correspondant à la dengue : dans les Caraïbes en 1635 et 1699 puis, simultanément, en Asie, en Afrique et en Amérique du Nord dans les années 1780. La diffusion mondiale du DENV se poursuit de 1823 à 1916; des épidémies sont rapportées en Afrique, en Inde et aux Amériques. La dengue est reconnue alors comme étant une maladie des ports et des régions côtières. Il est supposé que le commerce et le trafic d'esclaves ait été à l'origine de la répartition mondiale du virus.[29]

En 1907, à Fort McKinley (Philippines), Ashburn et Cray identifient pour la première fois l'agent causal de la dengue comme étant un virus. A peu près à la même époque, Graham en 1903 et Cleland en 1916, identifient *Aedes aegypti* comme le vecteur principal

29. Vasilakis, N. ; Weaver, S. C., *The history and evolution of human dengue emergence.* 08 ; Elsevier Inc. : jan. 2008 ; t. 72, p. 1–76.
30. Diallo, M. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2005**, *73* 445–9.
31. Wang, E et al. *J. Virol.*, **2000**, *74* 3227–34.
32. Gubler, D. J. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, *11* 480–96.
33. Rigau-Pérez, J. G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1998**, *59* 272–4.

de la dengue. En 1931, Simmons incrimine également le moustique *Aedes albopictus*.[29] En 1943, Hotta et Kimura, isolent l'agent responsable de la dengue pour la première fois. Un an plus tard, l'équipe de Sabin isole à nouveau le virus chez des soldats américains à Hawaï et en Nouvelle-Guinée. Le virus isolé à Hawaï fut appelé DENV-1 et celui de Nouvelle-Guinée, antigéniquement différent, DENV-2. Les deux autres sérotypes DENV-3 et DENV-4 seront isolés en 1956 durant l'épidémie de dengue hémorragique (DHF) à Manille (Philippines).[29]

Les effets de la seconde guerre mondiale ont profondément influencé l'épidémiologie globale de la maladie. Les bouleversements écologiques et démographiques faisant suite aux conflits ont favorisé une transmission importante du DENV dans toute la région Asie-Pacifique. La fin du conflit mondial entrainant une urbanisation incontrôlée avec le développement d'habitations insalubres, et disposant de mauvais systèmes de traitement des eaux, a conduit à une augmentation de la population du vecteur *Aedes aegypti* en contact avec l'homme et, par conséquent, a favorisé la circulation et la dispersion dans la région des différents sérotypes du DENV. Ces conditions ont permis l'émergence de DHF dans la région.

Alors que de nombreuses épidémies sont rapportées dans la zone Asie-Pacifique après la guerre 39-45, on observe une relative quiescence durant les vingt années suivantes en Amérique, en Afrique et en Océanie. Si le manque de suivi épidémiologique est peut-être une raison de cette faible activité apparente du virus pour le continent africain, en Amérique du Sud cela est clairement lié au programme d'élimination du vecteur *Aedes aegypti* par la PAHO (Pan American Health Organisation). L'objectif était alors de lutter contre le vecteur de la fièvre jaune (également *Aedes aegypti*), et, en 1970, le moustique était quasiment absent du continent sud américain. Malheureusement, le programme n'ayant pas été poursuivi, le vecteur (et les virus associés) ont rapidement proliféré à nouveau.[32] (Fig. 8)

Dans les années 60, on note une augmentation drastique de l'activité du DENV dans toutes les régions tropicales. En Inde et en Asie du Sud-Est, l'incidence mais aussi la gravité des cas de dengue augmentent. A la fin des années 60, ce sont les quatre sérotypes du DENV qui co-circulent dans cette région du globe. Des études de terrain menées en Thaïlande ont alors permis de mettre en évidence le lien entre la gravité de la maladie et une deuxième infection par un sérotype différent du premier. Cette observation conduit

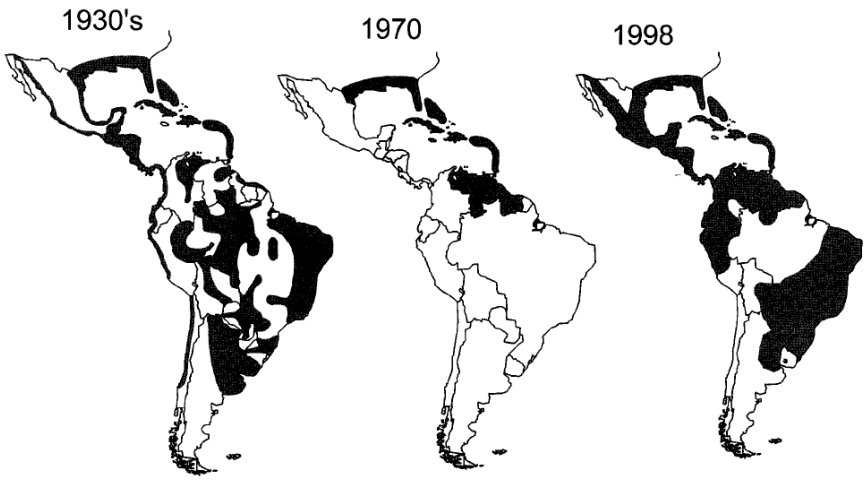



**Figure 8. Distribution d'*Aedes aegypti* en Amérique du Sud**

Scott Halstead à présenter sa théorie des « anticorps facilitants » [1](ADE pour antibody dependent enhancement).[34].

### 2.1.2 Épidémiologie et répartition actuelle

A l'aube du XXI[e] siècle, l'incidence, l'intensité et la gravité des épidémies de dengue ont dramatiquement augmenté.

Si les quatre sérotypes étaient déjà présents en Asie depuis la fin des années 60, les épidémies de dengue ayant eu lieu sur le continent sud-américain dans les années 60-70 étaient caractérisées par une hypoendémicité (circulation prépondérante d'un seul sérotype dans la région). Dans les années 80 à 90, les quatre sérotypes se sont répartis dans le monde, et, à la fin des années 2000, la présence globale des quatre sérotypes du DENV était complète.[6] (Fig. 9)

**Asie** Actuellement, la région Asie-Pacifique reste la plus touchée par la dengue. Plus de 70 % des personnes exposées à la dengue (1.8 milliard de personnes) vivent dans cette région.[35] Depuis la seconde guerre mondiale, la dengue est un grave pro-

1. Selon cette théorie une personne infectée par un sérotype donné développe des anticorps neutralisants ce même sérotype et dispose donc d'une immunité à vie contre ce sérotype. Mais, en plus de ces anticorps, la personne infectée produit des anticorps dit hétérologues contre les autres stéréotypes. Ces anticorps hétérologues ne protègent pas contre une sur-infection par un deuxième sérotype mais auraient au contraire un effet inverse aidant l'infection. Ce sont les anticorps facilitants.

34. Halstead, S. B. *Science*, **1988**, *239* 476–81.

35. WHO, *Dengue : Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*; World Health Organization : 2009.

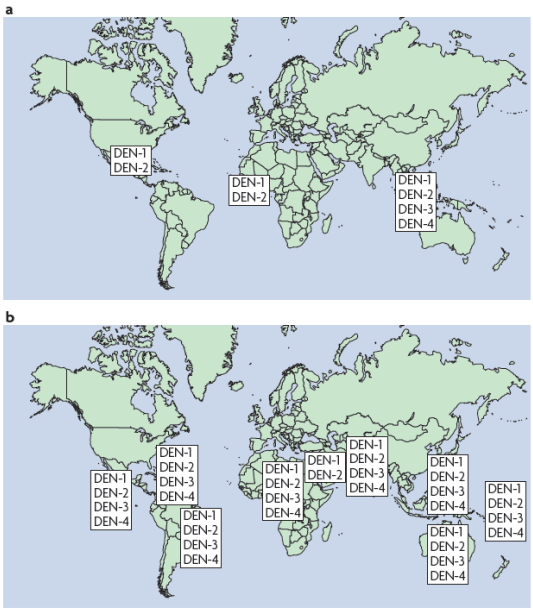



**Figure 9.** Changements dans la distribution des sérotypes de DENV - distribution en 1970 (**a**) et en 2004 (**b**)

blème de santé publique en Asie. L'urbanisation et l'accroissement de population y sont importants et ont favorisé les épidémies. Le Vietnam, la Thaïlande et les Philippines sont les pays les plus touchés.[36] Mais de petits pays comme Singapour, où la croissance démographique est extrême, ont montré des taux d'incidence très élevés.[37] En 2009, à l'exception de la Corée du Nord, tous les pays asiatiques avaient reporté des cas de dengue.[35] Malgré cette forte présence du virus en Asie, la surveillance de la maladie reste passive. L'OMS a lancé, sur la période 2008-2015, un plan de veille à grande échelle visant à améliorer les stratégies de lutte contre la dengue dans la région.[35]

**Amérique du Sud** En Amérique du Sud, la situation est particulièrement préoccupante. Les cas de dengue ont suivi la réinfestation progressive des zones forestières par *Aedes aegypti* malgré sa quasi-éradication dans les années 70.[32] L'incidence a augmentée drastiquement ces 30 dernières années. (Fig. 10)

**Situation globale** Aujourd'hui, la dengue se retrouve dans plus de 100 pays et est endémique dans presque toute la zone inter-tropicale. (Fig. 11) C'est l'arbovirose

36. Guzman, A. ; Istúriz, R. E. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, *36 Suppl 1* S40–2.
37. Ooi, E. ; Gubler, D. *Cad. Saúde Pública*, **2008**, *25* S115–S124.

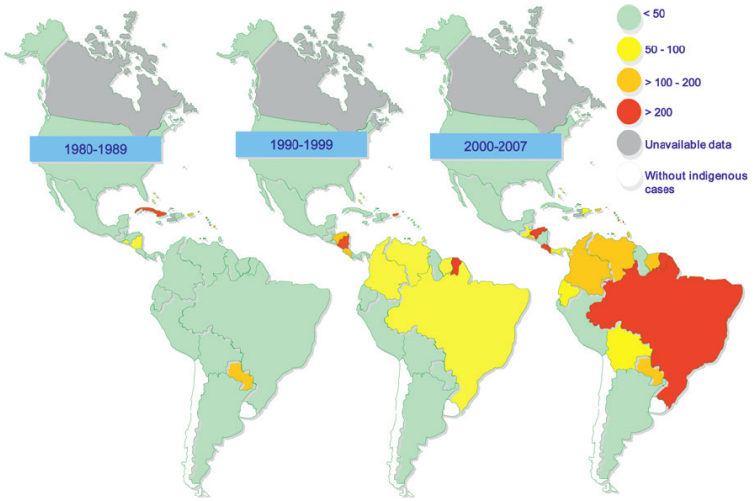



**Figure 10.** Incidence de la dengue sur le continent américain, pour 100000 habitants, par pays, entre 1980 et 2007[38]

qui s'est développée de la façon la plus rapide sur notre planète. Des facteurs comme la présence de larges territoires infestés par des moustiques du genre *Aedes*, la présence d'important groupes humains susceptibles d'être infectés et la co-circulation de plusieurs sérotypes du DENV sont responsables du caractère endémique et épidémique de cette infection. Les paramètres climatiques comme la température et les précipitations, influencent l'aire de répartition du vecteur. De plus, l'accroissement global de la population mondiale, la mobilité internationale, la pauvreté et le manque de programme de surveillance et de gestion des épidémies de dengue sont autant de facteurs influençant la répartition et l'impact global du virus.

Dans les 50 dernières années, l'incidence de la dengue a été multipliée par un facteur 30, concernant davantage de pays et passant, dans la dernière décennie, des zones urbaines aux zones rurales. Environ 2,5 milliards de personnes vivent dans des pays où la dengue est endémique et le nombre d'infections annuelles est estimé à 50 millions.[35]

Sur ces 50 millions d'infections annuelles, 500 000 provoquent des dengues hémorragiques. L'OMS estime à 22 000 le nombre de décès annuels dus à la dengue. Ces décès concernent principalement les enfants. En 2005, l'OMS adopte une résolution (WHA 58.3) classant la dengue comme maladie pouvant constituer une urgence sanitaire au niveau international de par le caractère épidémique et la répartition croissante du virus.[35]

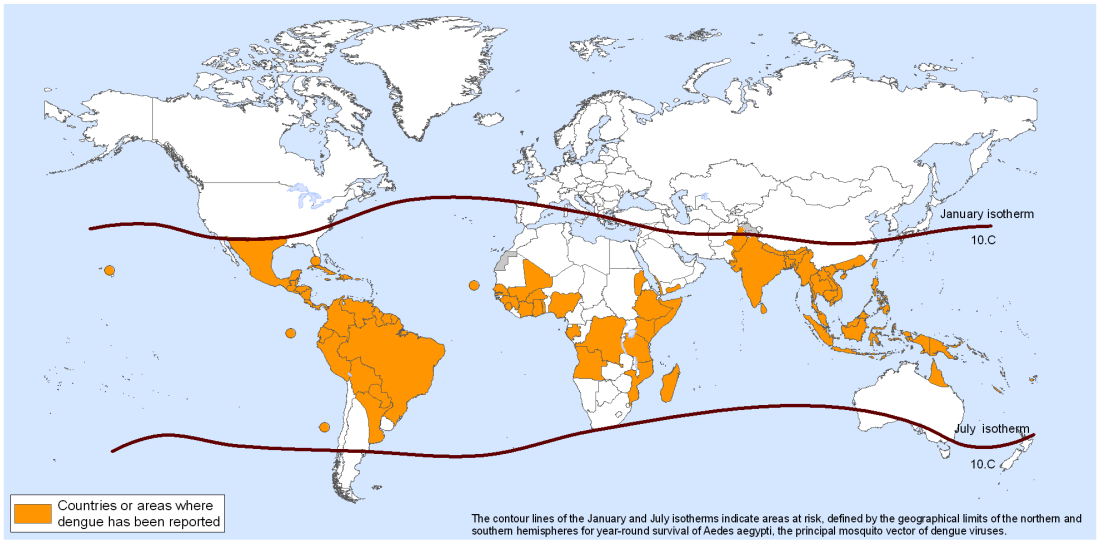



**Figure 11.** Zones avec risque de transmission du virus de la dengue en 2010[39]

### 2.1.3 Symptomatologie

Selon la définition de l'OMS en 1997, l'infection par le DENV peut être asymptomatique ou conduire aux manifestations cliniques de la dengue classique (DF dengue fever) ou de la dengue hémorragique (DHF dengue hemmorragic fever) qui peut, dans certains cas, se compliquer en dengue avec syndrome de choc (DSS dengue shock syndrome).[40] Voir Figure 12.

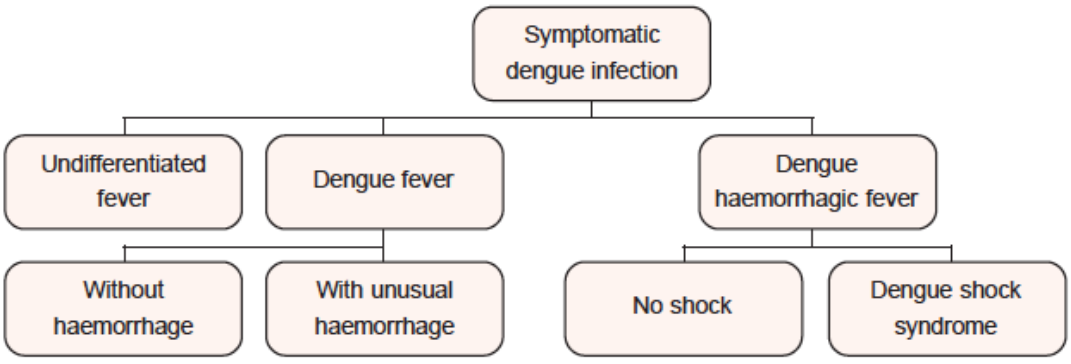



**Figure 12.** Classification des symptômes de la dengue - OMS 1997[40]

40. WHO, *Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention and control.* WHO, éd. ; WHO : jan. 1997.

## 2. LE VIRUS DE LA DENGUE ET L'INTÉRÊT DE LA NS5 POLYMÉRASE COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE

**Signes cliniques :**

**Dengue classique** La dengue classique *probable* est caractérisée par un état fébrile aigu associé à deux ou plus des manifestations suivantes :

- céphalée
- douleur rétro-orbitale
- myalgie
- arthralgie
- rash cutané
- manifestations hémorragiques
- leucopénie

et

- confirmation sérologique

ou

- autres cas de dengue *confirmée*[1] à la même place et au même moment

**Dengue hémorragique** Un diagnostic de cas de *dengue hémorragique* (DH) nécessite la présence de tous les éléments suivants : Fièvre aiguë durant 2 à 7 jours, tendance hémorragique, thrombocytopénie et signes de fuite plasmatique due à l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

**Dengue avec syndrome de choc** Un cas de *dengue avec syndrome de choc* (DSS) nécessite à la fois la présence des quatre critères définissant une *dengue hémorragique* (fièvre, tendance hémorragique, thrombopénie et fuite plasmatique) plus des signes de défaillance circulatoire tels qu'un pouls rapide et faible ou une hypotension.

La dengue présente un large panel de manifestations cliniques dont l'évolution est souvent difficilement prédictible. Si la plupart des patients présentent une évolution clinique favorable, une certaine proportion évoluera vers des formes plus sévères de la maladie caractérisées par une perte de plasma avec ou sans hémorragies. La classification des cas de dengue est nécessaire afin de traiter les malades de façon appropriée et

1. On parle de cas de dengue classique *confirmée* lorsque des critères biologiques de laboratoire (isolement du virus, augmentation des anticorps chez le patient par un facteur 4 ou plus, mise en évidences d'antigènes ou de séquences du génome du DENV) viennent conforter le diagnostic

en fonction de la gravité de leur cas. Une classification adéquate des cas est un outil indispensable et cela se révèle particulièrement vrai lors des épidémies, durant lesquelles les services de santé doivent faire face à un grand afflux de malades.

Or cette classification a montré ses limites. Plusieurs études ont rapporté les difficultés inhérentes à cette classification classique.[41–43] En 2005, l'OMS écrit que la classification s'avère inappropriée pour les quatre raisons suivantes[44] :

- Il existe un chevauchement entre les formes dengue classique et dengue hémorragique.
- Les quatre critères nécessaires à la définition OMS d'un cas de dengue hémorragique (fièvre, thrombopénie, hémorragie et signes de fuite plasmatique) sont difficiles à renseigner.
- Le terme « dengue hémorragique » met trop l'accent sur l'hémorragie alors que la grande différence entre une dengue sévère et une dengue classique n'est pas l'hémorragie mais l'augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une fuite de plasma. Ainsi la présence d'hémorragie se voit indifféremment dans les cas de dengue simples ou sévères.
- La classification est trop compliquée pour une utilisation pratique, notamment chez les enfants.

L'OMS propose alors une nouvelle classification, simplifiée et ne mettant plus l'accent sur la présence d'hémorragie ou le décompte des plaquettes.[35] Voir figure 13

Dans cette classification, c'est la *perméabilité vasculaire*, responsable d'une fuite plasmatique, qui devient le critère principal d'une dengue sévère. Les signes précoces de fuite de plasma sont l'hémoconcentration, les épanchements pleuraux et les ascites. Les signes de gravité d'une dengue sévère sont les signes de chocs circulatoires (froideur des extrémités, pouls radial faible, lenteur à la revascularisation capillaire), une altération de l'état de conscience, des hémorragies des muqueuses (hématémèse, méléna, saignements du nez ou des gencives) et des manifestations inhabituelles telles que lésions hépatiques importantes, cardiomyopathie, encéphalopathie et encéphalite.

41. Deen, J. et al. *Lancet*, **2006**, *368* 170–173.
42. Bandyopadhyay, S. et al. *Trop. Med. Int. Health.*, **2006**, *11* 1238–55.
43. Phuong, C. X. T. et al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2004**, *70* 172–9.
44. WHO, *Dengue , Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome in the Context of the Integrated Management of Childhood Illness*, 2005.

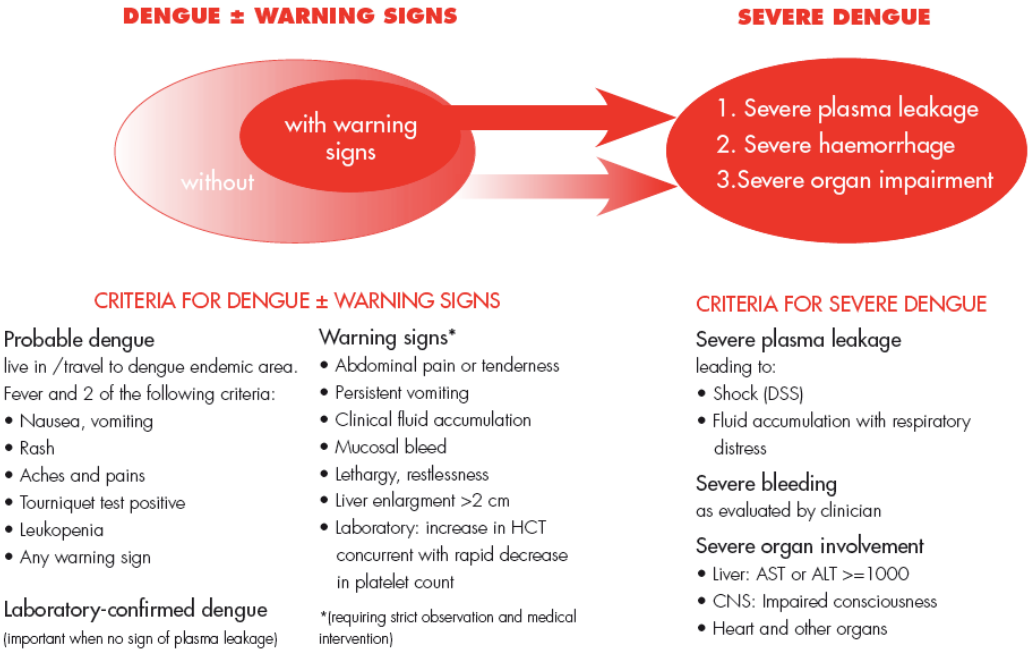



**Figure 13.** Classification des symptômes de la dengue - OMS 2009[35]

Ce nouveau système de classification à été proposé par un groupe d'expert (Genève, Suisse, 2008) et a été évalué et comparé avec l'ancien système de classification dans 18 pays. Les résultats récemment publiés de cette étude comparative concluent à une supériorité du nouveau système de classification par rapport à l'ancienne classification DF/DHF/DSS. Il s'est révélé plus sensible à la reconnaissance des cas sévères et particulièrement adapté à la gestion et au tri des cas sévères lors d'épidémies. Le nouveau système s'est également montré adapté à une classification rétrospective sur des bases de données d'épidémies passées, une qualité indispensable pour la surveillance épidémiologique de la dengue.[45] Il est à noter qu'actuellement la classification DF/DHF/DSS est toujours largement utilisée.

45. Barniol, J. et al. *BMC Infect. Dis.*, **2011**, *11* 106.

## 2.2 Le virus de la dengue

### 2.2.1 Cycle de vie

Le DENV appartient au genre *Flavivirus* de la famille des Flaviviridae. Cette famille de virus comprend notamment le virus de la fièvre jaune qui a donné son nom à la famille : Flaviviridae du latin *flavus*, jaune. Les deux autres genres de la famille sont les *Pestivirus* et les *Hepacivirus*. Ces derniers ont comme représentant connu le virus de l'hépatite C (HCV). Voir la figure 14 pour une classification des Flaviviridae.

| Taxonomic Unit | Representative Examples |
|---|---|
| Genus *Flavivirus* | |
| Tick-borne viruses | |
| Mammalian tick-borne group (15) | Tick-borne encephalitis virus, European subtype (TBEV-Eu) |
| | Tick-borne encephalitis virus, Far Eastern subtype (TBEV-FE) |
| Seabird tick-borne group (4) | Tyuleniy virus |
| Mosquito-borne viruses | |
| Aroa virus group (4) | Aroa virus |
| Dengue virus group (5) | Dengue virus, types-1 to 4 (DENV-1 to DENV-4) |
| | Kedougou virus |
| Japanese encephalitis group (10) | Japanese encephalitis virus (JEV) |
| | West Nile virus (WNV) |
| Kokobera virus group (2) | Kokobera virus |
| Ntaya virus group (6) | Ntaya virus |
| Spondweni virus group (2) | Spondweni virus |
| Yellow fever virus group (9) | Yellow fever virus (YFV) |
| Viruses with no known vector | |
| Entebbe bat virus group (3) | Entebbe bat virus |
| Modoc virus group (6) | Modoc virus |
| Rio Bravo virus group (7) | Rio Bravo virus |
| Unclassified (3) | Cell fusing agent virus |
| Genus *Pestivirus* | Bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), four serotypes |
| | Bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV-2), two serotypes |
| | Border disease virus, two serotypes |
| | Classical swine fever virus (CSFV), four serotypes[a] |
| | Pestivirus of giraffe (unclassified) |
| Genus *Hepacivirus* | Hepatitis C virus (HCV), six genotypes |
| | GB virus B (GBV-B) |
| Unclassified (2) | GB virus A (GBV-A), GBV-A-like viruses |
| | GB virus C (GBV-C), Hepatitis G virus (HGV) |

[a]CSFV was formerly called hog cholera virus (HCV). The name was changed to avoid confusion with hepatitis C virus. Numbers in parentheses refer to the number of virus species recognized within each group.

**Figure 14.** Membres de la famille des Flaviviridae[46]

Les Flaviviridae partagent des caractéristiques structurales communes et leur cycle de réplication est identique au sein de la famille. Ce sont des virions enveloppés composés d'une bicouche lipidique avec des glycoprotéines d'enveloppe (E) entourant la nucléocapside qui est elle constituée d'un ARN simple brin, positif, complexé à de multiples copies d'une protéine de capside (C).

La liaison des virus à la membrane externe de la cellule hôte se fait via des récepteurs spécifiques des protéines d'enveloppe. L'entrée des virus dans la cellule se fait par endo-

cytose. L'acidification du milieu endosomal conduit à la fusion de l'enveloppe des virions avec la membrane cellulaire puis à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Le matériel génétique viral joue trois rôles dans le cycle de vie du virus. C'est l'ARN messager (ARNm) pour la traduction de toutes les protéines virales, c'est également le modèle lors de la réplication de l'ARN viral et c'est enfin le matériel génétique qui sera inclus dans les particules virales nouvellement synthétisées. La figure 15 est une vue schématique du cycle de réplication du virus de la dengue.[47]

Comme pour le cycle de réplication, l'organisation du génome est globalement la même pour tous les Flaviviridae.

Les protéines virales sont produites comme une seule polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés. Cette polyprotéine sera par la suite clivée par des protéases cellulaires et virales. Les protéines structurales sont codées dans la partie N-terminale de la polyprotéine et les protéines non-structurales (NS) à la suite et jusqu'à la partie C-terminale. Ces protéines NS s'assemblent pour former le complexe de réplication virale. La réplication de l'ARN à lieu dans le cytoplasme, elle implique la synthèse d'un brin d'ARN intermédiaire de polarité négative. Le matériel génétique est ensuite encapsulé dans les nouveaux virions qui sont produits par bourgeonnement de la membrane du réticulum endoplasmique puis excrétés dans le milieu extracellulaire via les voies sécrétoires de la cellule hôte.[46]

Au sein des *Flavivirus* il existe quatre sérotypes différents du virus de la dengue appelés DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Les particules virales matures sont constituées d'une nucléocapside de symétrie icosahédrique ou isométrique et mesurent environ 50 nm. de diamètre.

L'ARN viral porte une coiffe à l'extrémité 5' mais pas de queue polyA en 3'. Après traduction et clivage co et post-traductionel, l'ARN code pour trois protéines structurales : protéines de capside (C), prémembranaire (prM) et d'enveloppe (E) ainsi que pour sept protéines non-structurales : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5. Voir figure 16

47. Massé, N. et al. *Virologie*, **2007**, *11* 121–33.
46. Lindenbach, B. et al. *Fields Virology*, **2007** 1101–1152.

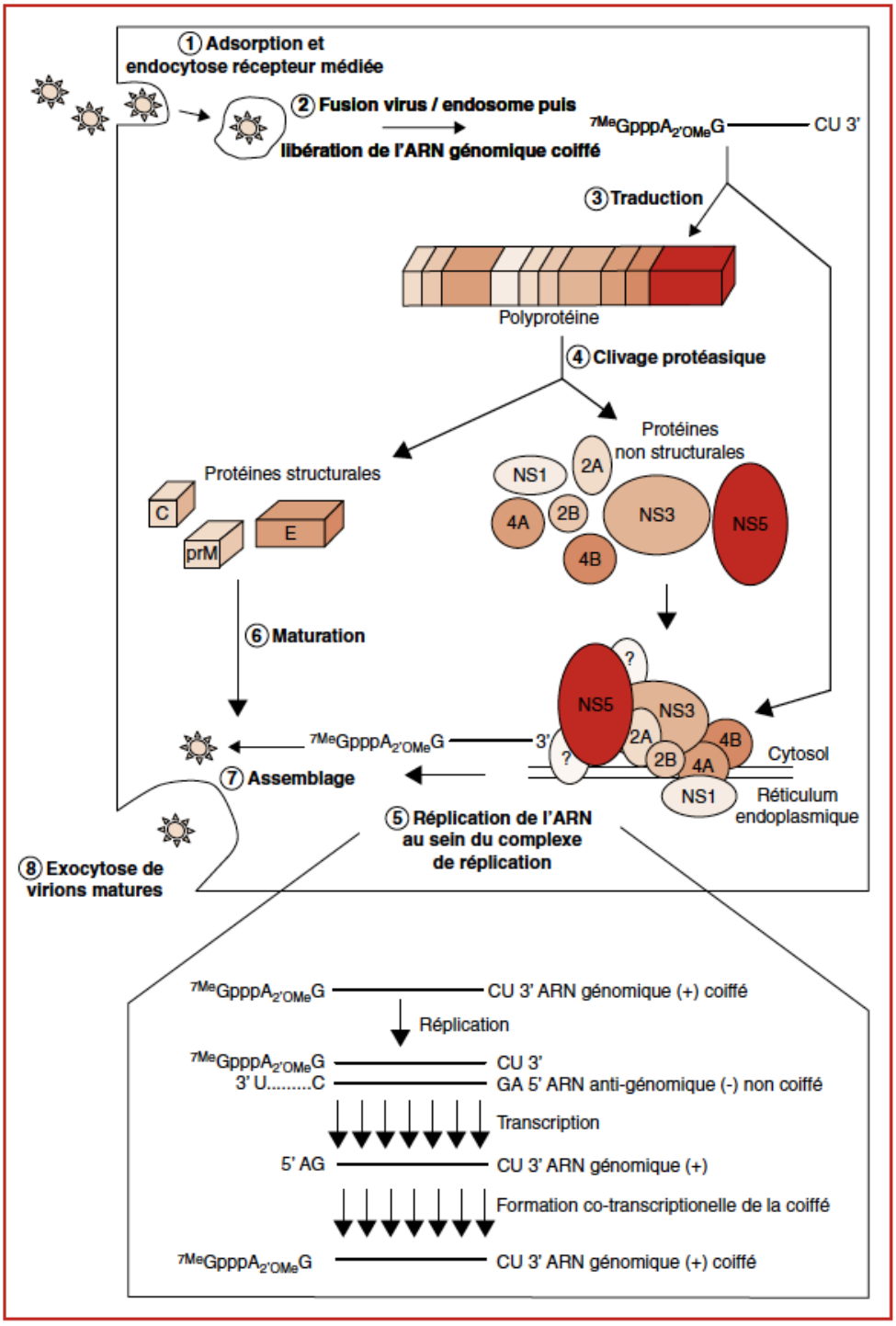



**Figure 15.** Cycle réplicatif du virus de la dengue d'après Massé *et al.*[47]

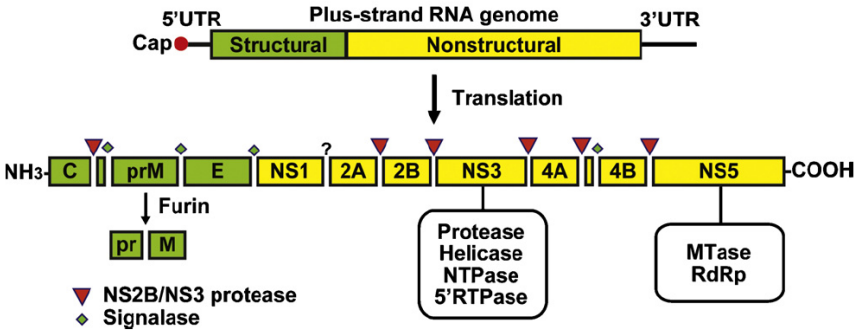



**Figure 16. Génome et polyprotéine du virus de la dengue** - En vert les 3 protéines structurales et en jaune les 7 protéines non-structurales. Les sites de clivage de la polyprotéine par la NS2B/NS3 protéase virale et par les signalases de l'hôte sont indiqués. Les activités enzymatiques des NS3 et NS5 sont également indiquées.[48]

### 2.2.2 Protéines virales et cibles thérapeutiques

Toutes les protéines structurales et non-structurales sont nécessaires à la réplication et à la vie du virus, elles constituent de fait des cibles potentielles pour des antiviraux.[48,49] Dans cette partie, nous étudierons la structure et le rôle de ces différentes protéines au cours du cycle de réplication. Nous insisterons sur les protéines actuellement considérées comme des cibles thérapeutiques privilégiées : la protéine d'enveloppe et les protéines non-structurales NS3 et NS5. En effet, ces protéines portent des fonctions nécessaires à l'infection et la réplication du virus et leur structure tridimensionnelle est connue. D'autre part, les protéines non-structurales NS3 et NS5 étant les plus conservées chez les quatre sérotypes du DENV, il est raisonnable d'espérer qu'un inhibiteur développé contre un sérotype particulier soit également actif sur les quatre autres sérotypes.[47]

#### 2.2.2.1 Protéines structurales

**La protéine de Capside. (C)** Elle est essentielle à l'assemblage du virus lors du bourgeonnement pour une encapsidation spécifique de l'ARN viral. La caractérisation structurale de la protéine C en solution a permis de mettre en évidence sa structure sous forme d'homodimère et a donné des informations quant à son rôle précis. Le dimère de la protéine C présente en effet une charge nette élevée et une distribution asymétrique

48. Sampath, A. ; Padmanabhan, R *Antivir. Res.*, **2009**, *81* 6–15.
49. Stevens, A. J. et al. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52* 7911–26.

des résidus basiques à la surface de la protéine. A l'inverse, des régions hydrophobes conservées forment une surface apolaire sur la face opposée. Les propriétés physico-chimiques de ce dimère permettent de proposer un modèle pour son interaction entre l'ARN (chargé négativement) et la membrane virale.[50] Voir Fig. 17

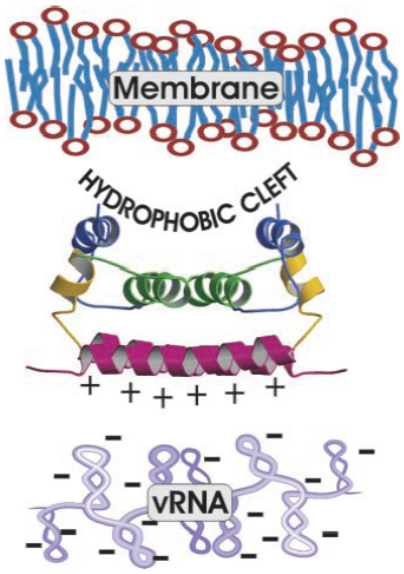



**Figure 17. Protéine de Capside du DENV** - Au centre la protéine C, la membrane virale est sur le dessus, proche de la partie hydrophobe. L'ARN viral est lié a la partie chargée positivement de la protéine C.[50]

**La protéine de Membrane (M)** Elle existe sous forme de précurseur ou pré-protéine M (prM). Une des fonctions majeures de prM est de prévenir le réarrangement acido-catalysé prématuré de la protéine E durant son transit par les voies sécrétoires cellulaires. La conversion des virions immatures en virions matures se fait dans les voies sécrétoires et correspond au clivage du précurseur prM en pr et M par une protéase du Golgi. Après le clivage, les hétérodimères formés entre prM et la protéine d'enveloppe (E) sont dissociés, le fragment pr est relâché et il se forme des homodimères de la protéine E.[46] Voir Fig. 18

**La protéine d'Enveloppe (E)** La protéine E est constituée de trois domaines protéiques. Un domaine I localisé centralement, un domaine II qui contient la séquence pour

50. Ma, L. et al. *PNAS*, **2004**, *101* 3414–9.

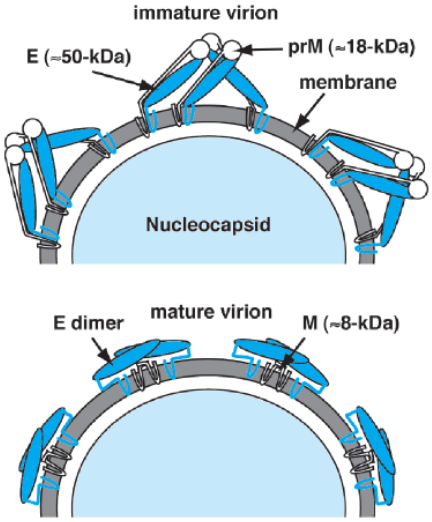



**Figure 18.** Protéines d'enveloppe et membranaire au cours de la maturation du DENV[46]

un peptide (peptide de fusion) impliqué dans la fusion du virus avec la membrane de l'endosome et le relargague de l'ARN viral dans le cytosol. Le domaine III serait impliqué dans la liaison aux récepteurs cellulaires permettant l'entrée du virus dans la cellule. Ce domaine est également un domaine antigénique impliqué dans la neutralisation des anticorps de l'hôte.[46] Voir Fig.19

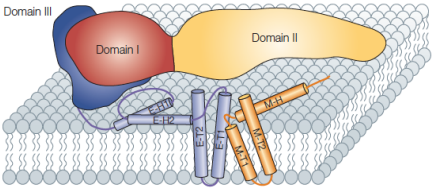



**Figure 19.** Représentation schématique de la protéine E du DENV[51]

Il existe pour l'instant peu d'informations quant aux mécanismes impliqués dans la liaison des flavivirus à leurs cellules cibles.[51] Mais certains récepteurs cellulaires comme DC-SIGN (Dendritic-Cell Specific ICAM Grabbing Non-integrin), GRP78/BIP (Glucose Regulating Protein 78), des molécules associées au CD-14, l'héparan-sulfate et plus récemment le récepteur CLEC5A (Human C-type Lectin-like molecule) ont été

51. Mukhopadhyay, S. et al. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3* 13–22.

suggérés comme de possibles récepteurs cellulaires du virus de la dengue.[52–57]

L'activation de récepteurs comme les PAFR (Platelet Activation Factor Receptor) à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes induit une augmentation de la perméabilité vasculaire, une hypotension et la production de cytokines. Leur activation serait responsable des formes sévères de dengue.[58]

Un mode d'entrée du virus particulier est observé dans le cas de l'infection de monocytes et de macrophages. Le fait que les particules virales soient opsonisées par des anticorps anti-dengue permet la liaison aux récepteurs Fc et facilite l'entrée du virus dans la cellule. Cette infection facilitée par les anticorps est suspectée d'être liée au cas sévères de dengue.[34]

Une fois l'attachement à la cellule cible et la liaison aux récepteurs cellulaires effectuée, le DENV pénètre dans la cellule par endocytose. Le pH acide à l'intérieur de l'endosome conduit à un réarrangement structural de la protéine E qui passe de la forme dimère à la forme monomère pour finalement former des trimères qui induiront la fusion des membranes du virus et de l'endosome.[59] Voir Fig. 20

**Inhibiteurs de l'entrée du virus.** Il existe actuellement une petite dizaine de molécules ayant montré une activité anti-dengue en ciblant l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Une des plus intéressantes est sans doute le composé **13** issu d'un criblage *in silico* à haut débit (HTD pour high-troughput docking) de quelques 586000 molécules d'une chimiothèque Novartis envers une poche hydrophobe de la protéine E du DENV-2. De ce criblage émerge une série de quinazolines qui sont par la suite synthétisées puis testées sur le virus. Le composé Novartis présente une $CI_{50}$ de 119 nM sur DENV-2 dans des lignées cellulaires humaines. Des expériences d'ajout dans le temps (time of addition experiences) ont permis de montrer que les composés agissaient au moment de l'entrée du virus dans la cellule. Un marquage immunofluorescent a mis en évidence l'accumulation du virus dans l'endosome ce qui est consistant avec un mécanisme d'inhibition de la

52. Chen, Y. et al. *Nat. Med.*, **1997**, *3* 866–871.
53. Chen, Y. C. et al. *J. Virol.*, **1999**, *73* 2650–7.
54. Navarro-Sanchez, E. et al. *EMBO Rep.*, **2003**, *4* 723–8.
55. Tassaneetrithep, B. et al. *J. Exp. Med.*, **2003**, *197* 823–9.
56. Jindadamrongwech, S et al. *Arch. Virol*, **2004**, *149* 915–27.
57. Watson, A. a. et al. *J. Biol. Chem.*, **2011** 1–23.
58. Souza, D. G. et al. *PNAS*, **2009**, *106* 14138–43.
59. Modis, Y. et al. *PNAS*, **2003**, *100* 6986–91.

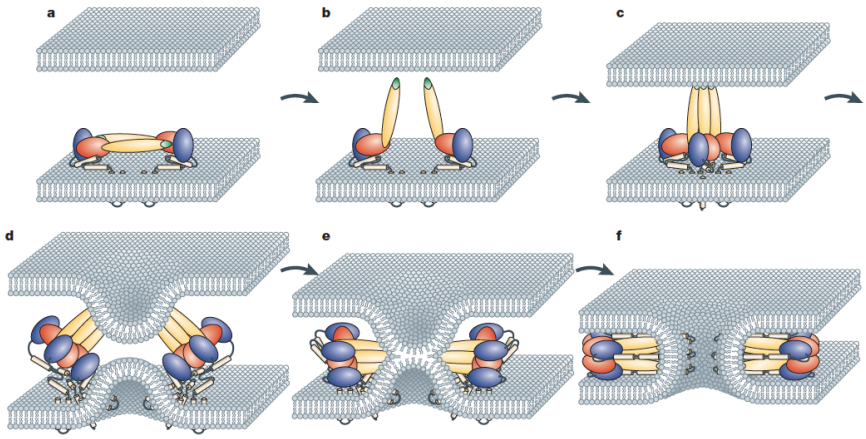


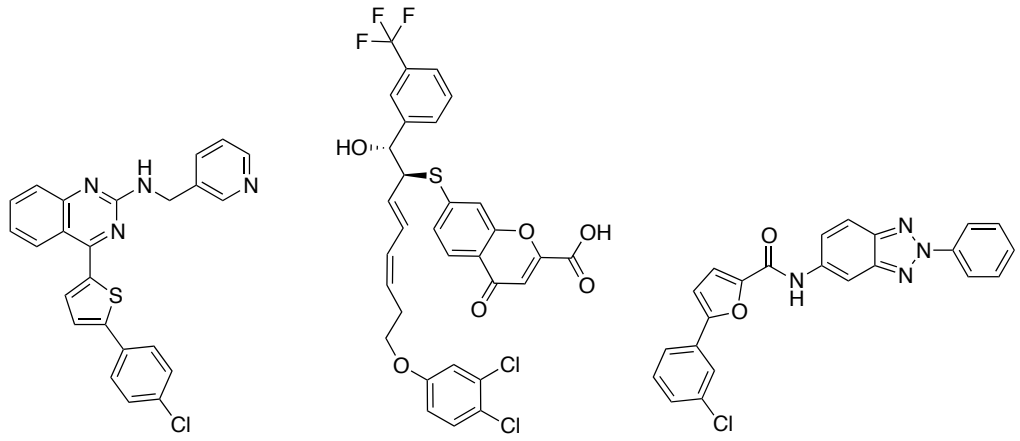

**Figure 20. Mécanisme de fusion médié par la protéine E** - En haut se trouve la membrane de l'endosome, en bas la membrane virale.(**a**) Protéine E à la surface du virus sous forme de dimère.(**b**) La protéine E se lie à un récepteur et est internalisée dans l'endosome. En milieu acide, le domaine II bascule à l'extérieur et pointe vers la membrane cellulaire de l'hôte. (**c**) Trimérisation de la protéine E. (**d**) Le domaine III bascule sur lui-même et rapproche la membrane virale vers le peptide de fusion et la membrane cellulaire de l'hôte. (**e**) Alors que le domaine II et III se rapprochent il y a fusion des deux parois. (**f**) Un pore est formé, il permettra le passage de l'ARN viral vers le cytosol de la cellule hôte.[51]

fusion membranaire. Cependant l'évaluation *in vivo* de cette série est empêchée par une faible solubilité.[60]

La même équipe a recherché des inhibiteurs de l'entrée du virus en ciblant cette fois une autre poche de la protéine E que l'on peut observer à l'interface des domaines I et II. Des ligands de cette poche sont supposés interférer avec les changements conformationnels de la protéine E, essentiels à la fusion avec l'endosome. La même démarche de sélection par criblage *in silico* suivi de la synthèse et de la validation biologique des candidats sélectionnés a mis en évidence le produit (**14**) qui montre une réduction du titre viral de DENV avec une $CE_{50}$ de 9.8 $\mu$M.[61]

L'équipe de Kobe a aussi criblé des candidats par docking mais cette fois-ci en ciblant une poche située à l'interface des domaines I et III de la protéine E. Sept composés sans similarité structurale ont été identifiés, synthétisés et leur activité antivirale confirmée. Le meilleur (**15**) montre une $CI_{50}$ de 4 $\mu$M sur DENV-2 in cellulo.[62]

60. Wang, Q.-Y. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, *53* 1823–31.
61. Poh, M. K. et al. *Antivir. Res.*, **2009**, *84* 260–6.
62. Yennamalli, R. et al. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **2009**, *23* 333–41.



**13** **14** **15**

**Figure 21.** Inhibiteurs de l'entrée du DENV

En 1997, Marks *et al.* montrent que le DENV utilise une forme hautement sulfatée de glycosaminoglycane (GAG), le sulfate d'héparane présent à la surface des cellules hôtes comme récepteur.[52] A partir de cette découverte, l'hypothèse est émise que des GAG solubles pourraient se lier aux particules virales extracellulaires et donc réduire l'infectivité du DENV. Voir Figure 22.

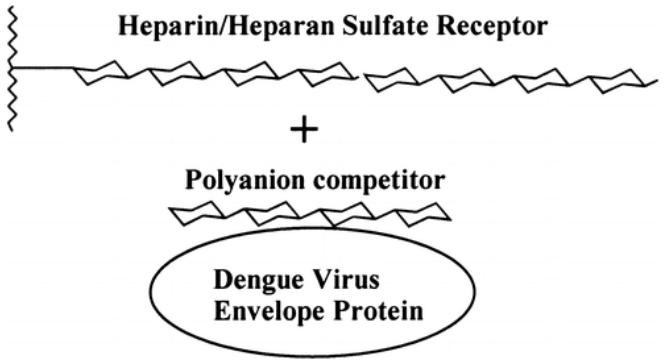
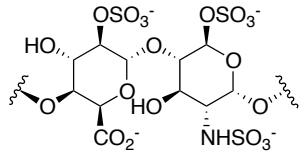



**Figure 22.** Schéma du mécanisme antiviral des composés polyanioniques[63]

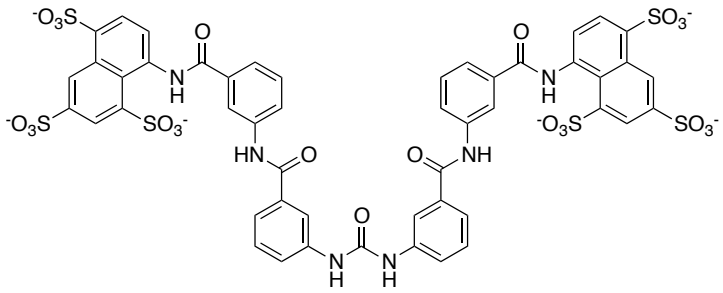
La même équipe a évalué une série de dérivés diversement sulfatés et polymérisés définissant ainsi une taille, une densité de charge et un degré de flexibilité optimum pour une forte liaison aux particules virales.[63] L'héparine (**16**) et la suramine (**17**) ont ainsi montré des constantes d'affinité pour le DENV de l'ordre de 50 nM. Cependant

63. Marks, R. M. et al. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44* 2178–87.

lors de l'évaluation de la suramine (**17**) *in vivo* sur des souris infectées par DENV-2, aucun effet bénéfique n'a été noté sans doute à cause de la clairance systémique rapide du produit.[64]



**16**



**17**

Une autre stratégie envisageable pour inhiber le processus de fusion du virus serait l'obtention d'analogues peptidiques de la protéine E ou de parties de celle-ci. Ces analogues, par affinité avec les protéines E virales, empêcheraient les changements conformationnels nécessaires à la fusion virus-endosome. C'est le mécanisme d'action de l'Enfuvirtide (Fuzeon® Roche), un analogue peptidique de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il a d'ailleurs été montré que des analogues exogènes du domaine III de la protéine d'enveloppe du DENV limitaient son infectivité.[65] Cependant, il faut noter que les antiviraux de type peptidique souffrent d'une faible absorption au niveau du tractus gastro-intestinal et requièrent souvent une délivrance intra-veineuse. De plus, leur production se révèle souvent très coûteuse et ils seraient vraisemblablement inaccessibles aux populations souffrant de la dengue. A titre d'exemple la synthèse industrielle de l'Enfuvirtide se réalise en pas moins de 106 étapes ![66]

#### 2.2.2.2 Protéines non-structurales

**NS1** La première des protéines NS est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) comme une glycoprotéine hydrosoluble qui évoluera en dimères plus hydrophobes et liés aux membranes au cours de sa maturation.[46] La NS1 aurait un rôle important mais encore mal défini dans la réplication de l'ARN viral.[46,67]La forme circulante ex-

64. Lee, E. et al. *Antivir. Res.*, **2006**, *69* 31–8.
65. Liao, M. ; Kielian, M. *J. Cell Biol.*, **2005**, *171* 111–20.
66. Bray, B. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2* 587–593.
67. Mackenzie, J. M. et al. *Virology*, **1996**, *220* 232–40.

tracellulaire de la protéine NS1 est également impliquée dans la réponse humorale de l'hôte envers le virus : lors de la phase aigüe de l'infection par le DENV, la protéine NS1 est excrétée massivement dans le milieu extracellulaire sous forme d'hexadimères[68] ce qui en fait un antigène de choix pour la détection précoce d'une infection par le DENV.[44,69]

**NS2** Constituée de NS2A et NS2B. NS2A est une petite protéine ($\approx$ 22 kd) hydrophobe nécessaire à une élaboration correcte de la NS1.[70] La NS2B est également de petite taille ($\approx$ 14 kd) et sert de cofacteur à la protéase NS2B/NS3[46,71]

**NS3** La NS3 est une grosse protéine ($\approx$ 70 kd) multifonctionnelle qui porte différentes activités nécessaires à la maturation de la polyprotéine et à la réplication de l'ARN. Dans sa partie N-terminale, associée à son co-facteur NS2B de façon covalente, la NS2B/NS3 a une fonction sérine-protéase et permet le clivage protéique aux jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5.[46,72] (Fig. 16) La partie C-terminale est multifonctionnelle et présente des activités nucléoside triphosphatase (NTPase)/hélicase et ARN 5' triphosphatase (RTPase), essentielles à la réplication de l'ARN viral.[73] L'hydrolyse des nucléosides triphosphatés (NTP) catalysée par la NTPase fournirait l'énergie chimique nécessaire au fonctionnement de l'hélicase. Le rôle principal de l'hélicase est le désenroulement de l'ARN double brin lors de la réplication. La structure cristalline de l'hélicase/NTPase rend bien compte de ces fonctions.[74,75] (Fig. 25)

**Inhibiteurs de la protéase du virus.** La protéase NS3 est une cible de choix pour le développement de thérapies anti-dengue puisqu'elle est nécessaire à la réplication virale.[71] De plus, les inhibiteurs de protéase ont été développés avec succès en tant qu'agents thérapeutiques anti-VIH[76] et pourraient bientôt apporter des solutions intéressantes pour le traitement de HCV[77] bien que les résistances à ce type de traitements

68. Flamand, M et al. *J. Virol.*, **1999**, *73* 6104–10.
69. Alcon, S. et al. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**, *40* 376.
70. Falgout, B et al. *J. Virol.*, **1989**, *63* 1852–60.
71. Falgout, B et al. *J. Virol.*, **1991**, *65* 2467–75.
72. Lescar, J. et al. *Antivir. Res.*, **2008**, *80* 94–101.
73. Li, H et al. *J. Virol.*, **1999**, *73* 3108–16.
74. Xu, T. et al. *J. Virol.*, **2005**, *79* 10278.
75. Wu, J. et al. *J. Virol.*, **2005**, *79* 10268–10277.
76. Anderson, J. et al. *Handbook of experimental pharmacology*, **2009** 85–110.
77. Chatel-Chaix, L. et al. *Viruses*, **2010**, *2* 1752–1765.

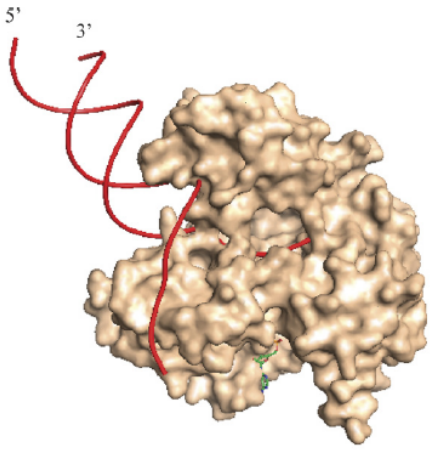
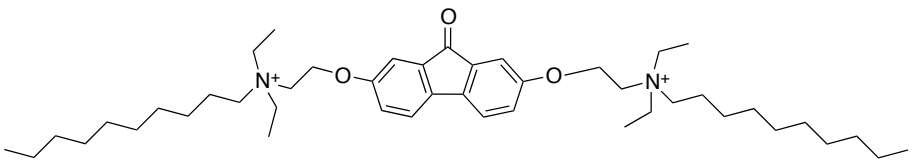



**Figure 25.** Structure tridimensionnelle de l'hélicase du DENV et de son substrat : l'ARN viral[72]

semblent apparaître rapidement.[78]

Parmi les molécules ayant montré une activité sur la protéase du DENV, on pourra notamment citer le composé BP2109 (**18**) qui inhibe la sérine-protéase NS2B/NS3 avec une $CI_{50}$ de 15.4 µM chez les quatre sérotypes du DENV et sans cytotoxicité. Sur le réplicon DENV-2, la $CE_{50}$ est de 0.17 µM. Des études mutationelles ont mis en évidence que BP2109 (**18**) agissait vraisemblablement dans une poche hydrophile du cofacteur NS2B.[79]

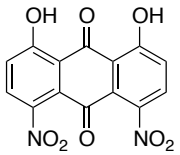



BP2109 (**18**)

L'équipe de Tomlinson a mis en évidence l'activité inhibitrice du composé ARDP0006 (**19**), un dérivé de type anthracène identifié lors d'un screening *in silico* envers la protéase du DENV-2. Cette molécule possède une $CE_{50}$ *in cellulo* sur le DENV-2 de 4 µM et une cytotoxicité de 69 µM (lignée cellulaire LLC-MK2).[80] Par la suite, l'étude des relations structure-activité (RSA) de composés de type anthracène a été entreprise per-

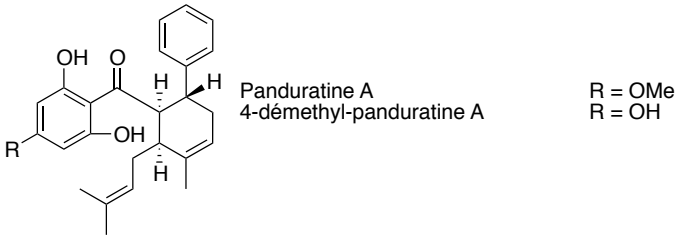
78. Wensing, A. M. J. et al. *Antivir. Res.*, **2010**, *85* 59–74.
79. Yang, C.-C. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, *55* 229–238.
80. Tomlinson, S. M. et al. *Antivir. Res.*, **2009**, *82* 110–4.

mettant de sélectionner des analogues plus actifs et de progresser dans la compréhension du mécanisme d'action de ces produits. Ils interagiraient avec des résidus conservés de la NS3 ce qui rend l'apparition de souches résistantes moins probables.[81]




ARDP0006 (**19**)

L'étude phytochimique de *Boesenbergia rotunda*, une espèce de la famille des Zingiberaceae, a mis en évidence la présence de dérivés de chalcone : la panduratine A (**20**) et la 4-démethyl-panduratine A (**21**) qui présentent des $CI_{50}$ de 21 et 25 µM respectivement sur la protéase NS3 du DENV-2.[82]

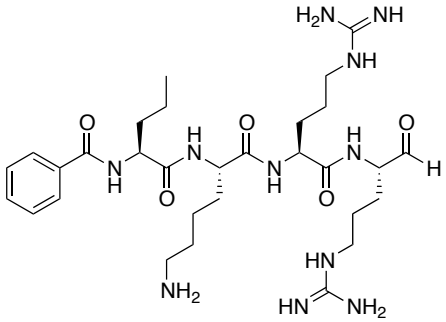



Panduratine A (**20**) et 4-démethyl-panduratine A(**21**)

La NS3 portant une activité protéase il est évident de chercher des analogues du substrat comme inhibiteurs, c'est à dire des composés de nature peptidique. Mais, comme signalé page 42, ces produits présentent souvent une faible biodisponibilité. La protéase NS3 est affine pour les substrats dibasiques comme par exemple le composé **22** qui présente une $CI_{50}$ de 5.8 µM sur la protéase.[83] L'ajout d'une « tête » électrophile de type acide boronique au composé **22** permet d'augmenter sa constante d'affinité pour la protéase du DENV et on passe alors d'un $K_i$ supérieur à 500 µM à un $K_i$ de 43 nM.[84]

**NS5** Comme la NS3, la NS5 est une protéine multifonctionelle : elle a une fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp pour RNA-dependent RNA polymerase)

81. Tomlinson, S. M. ; Watowich, S. J. *Antivir. Res.*, **2011**, *89* 127–35.
82. Kiat, T. S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16* 3337–40.
83. Li, J. et al. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280* 28766–74.
84. Yin, Z. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16* 36–9.



Un inhibiteur peptidique de la NS3 du DENV (**22**)

et une fonction méthyltransférase (MTase).[85] C'est la plus grande (900 acides aminés) et la plus conservée des protéines dans le génome de la dengue (67 % d'identité de séquence parmi les quatre sérotypes).[86] En 2007, le domaine catalytique RdRp de la NS5 de la dengue à été cristalisé.[87] (Fig. 30).

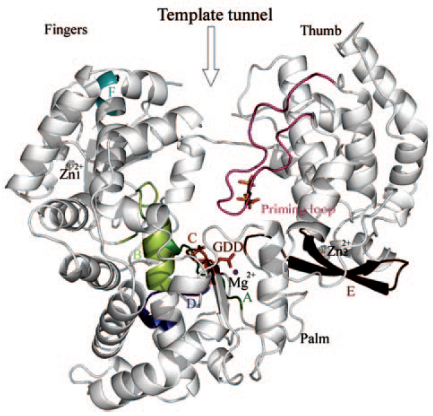



**Figure 30.** Structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase ARN-dépendante du DENV[87]

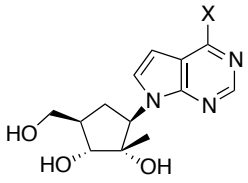
**Inhibiteurs de la polymérase du virus.** L'ARN polymérase ARN dépendante des Flavivirus est considérée comme une cible thérapeutique de choix. En effet, d'une part l'activité ARN polymérase est nécessaire à la réplication virale et d'autre part les cellules de l'hôte humain sont dépourvues de telles polymérases.[88]La validité des poly-

85. Rawlinson, S. M. et al. *Curr. Drug Targets*, **2006**, *7* 1623–38.
86. Perera, R. ; Kuhn, R. J. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2008**, *11* 369–77.
87. Yap, T. L. et al. *J. Virol.*, **2007**, *81* 4753–65.
88. Cerutti, H. ; Casas-Mollano, J. A. *Curr. Genet.*, **2006**, *50* 81–99.

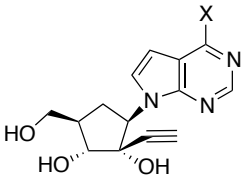
mérases virales en tant que cibles thérapeutiques est mise en évidence par l'usage en clinique d'inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH, de la polymérase de l'hépatite B ou du virus de l'herpès.[89] Chez les Flaviviridae, on peut noter qu'il existe plusieurs inhibiteurs de la RdRp du virus de l'hépatite C (HCV) engagés dans des essais cliniques.[90]

L'activité polymérase peut être ciblée soit en utilisant des analogues de nucléosides soit par des composés non-nucléosides qui cibleront dans ce cas des sites allostériques de l'enzyme.

**Analogues nucléosidiques** Les analogues 2′-C méthylé des ribonucléosides sont connus pour présenter une activité anti-HCV en agissant comme des analogues du substrat de la RdRp virale. Ainsi la 7-déaza-2′C-Me-adénosine (**23**), un inhibiteur submicromolaire de la RdRp d'HCV a été évaluée envers la RdRp d'autres flavivirus et a montré une $CE_{50}$ de 15 µM sur la polymérase du DENV-2. Ce composé présente des caractéristiques pharmacocinétiques (clairance, demi-vie, biodisponibilité) particulièrement intéressantes et ne montre pas de toxicité chez la souris jusqu'à $2\,g\,kg^{-1}$.[91] Le NITD008 (**24**), un analogue substitué par un groupement ethynyl en 2', a montré une activité largement améliorée sur le DENV-2 avec une $CI_{50}$ de 0.64 µM. Administré deux fois par jour à une dose de $10\,mg\,kg^{-1}$ chez la souris, le NITD008 (**24**) induit une protection complète vis-à-vis d'une injection létale de DENV-2.[92] Son activité est vérifiée sur les quatre sérotypes du DENV.[93] Le NITD008 (**24**) fait l'objet d'un dépôt de brevet par Novartis.[94]




7-deaza-2′-C-Me-adenosine (**23**)

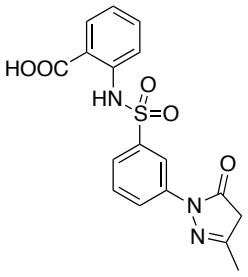



NITD008 (**24**)

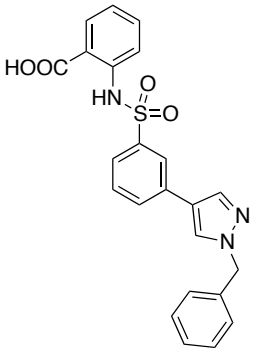
89. De Clercq, E. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2005**, *8* 552–60.
90. De Francesco, R.; Carfí, A. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2007**, *59* 1242–62.
91. Olsen, D. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48* 3944.
92. Yin, Z. et al. *PNAS*, **2009**, *106* 20435–9.
93. Latour, D. R. et al. *Antivir. Res.*, **2010**, *87* 213–22.
94. YIN, Z. S. et al. *Novel nucleosides analogues for the treatment of viral infections*, 2008.

## 2. LE VIRUS DE LA DENGUE ET L'INTÉRÊT DE LA NS5 POLYMÉRASE COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE

**Analogues non-nucléosidiques** En 2009, l'Institut Novartis sur les maladies tropicales, publie le premier inhibiteur allostérique de l'ARN polymérase du DENV. Un criblage haut débit sur une version recombinante de la NS5 du DENV-2 avec une matrice polyG et incorporation de $^{3}$H-GTP comme substrat radioactif est mis en place sur la chimiothèque Novartis qui comporte près d'un million de composés. Le produit **25** est identifié. Il présente une $CI_{50}$ de 7.2 µM sur la RdRp du DENV-2. La recherche d'analogue de **25** conduit à l'acide *N*-sulfonylanthranilique (**26**) et a permis d'amener la $CI_{50}$ à 0.7 µM .[95] De façon remarquable, l'acide *N*-sulfonylanthranilique (**26**) se montre sélectif de la RdRp du DENV; il ne présente aucune inhibition de la RdRp du virus du West-Nile (WNV) et des $CI_{50} > 100$ µM vis-à-vis de celles de HCV et de l'ADN polymérase humaine ont été rapportées. L'étude du mécanisme d'action de ces composés a été approfondie.[96] il a été montré qu'en plus d'empêcher l'élongation d'une matrice poly-G, l'inhibition était également effective sur la synthèse *de novo* d'un ARN pseudo-viral ($CI_{50}$ de 5 µM). Bien qu'aucun co-cristal entre le compsé **26** et la polymérase NS5 n'ait été obtenu, différentes analyses ont permis de montrer que l'acide N-sulfonylanthranilique (**26**) se liait à un résidu situé dans le tunnel à ARN de la polymérase. Ces composés agiraient ainsi en bloquant ce tunnel. Il semblerait cependant que ces composés n'exercent pas leur activité antivirale *in cellulo*, vraisemblablement à cause d'une mauvaise pénétration de la paroi cellulaire.




Hit Novartis (**25**)




Acide *N*-sulfonylanthranilique (**26**)

95. Yin, Z. et al. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52* 7934–7.
96. Niyomrattanakit, P. et al. *J. Virol.*, **2010**, *84* 5678–5686.

# Chapitre 3

# Essai biologique RdRp NS5 polymérase utilisé dans cette étude

Pour les raisons évoquées au chapitre précédent, la NS5 polymérase apparait comme une des cibles les plus intéressantes lors de la recherche d'inhibiteurs du virus de la dengue. L'équipe de virologie de l'AFMB de Marseille travaille depuis plusieurs années sur le DENV et est à l'origine d'avancées majeures dans la connaissance de la structure de la protéine NS5. L'équipe a ainsi publié la structure cristalline du domaine méthyltransférase de la NS5 du DENV en 2002.[97] Par la suite, le domaine ARN polymérase de la NS5 du WNV[98] puis du DENV[87] sont cristallisés.

Un test adapté au criblage à haut-débit d'inhibiteurs de la NS5 polymérase du DENV a été mis en place à l'AFMB.[99] Le principe du test de criblage des inhibiteurs est illustré sur la figure 35.

Les essais biologiques sont menés dans des plaques 96 puits. Dans chaque puits sont incubés simultanément, dans un milieu tampon, la NS5 polymérase du DENV et une matrice polycytosine (**polyC**) qui mimera l'ARN viral, le substrat habituel de la NS5. Des nucléotides de guanosine tritiés (**G***) et non tritiés (**G**) sont également incorporés. Par la suite, l'inhibiteur est ajouté.

Si l'inhibition est efficace, il n'y aura pas d'incorporation de nucléotides tritiés, en revanche, si l'inhibiteur est inefficace, la synthèse du brin polyG a lieu avec incorporation

97. Egloff, M.-P. et al. *The EMBO journal*, **2002**, *21* 2757–68.
98. Malet, H. et al. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282* 10678–89.
99. Selisko, B. et al. *Virology*, **2006**, *351* 145–58.

## 3. ESSAI BIOLOGIQUE RDRP NS5 POLYMÉRASE UTILISÉ DANS CETTE ÉTUDE

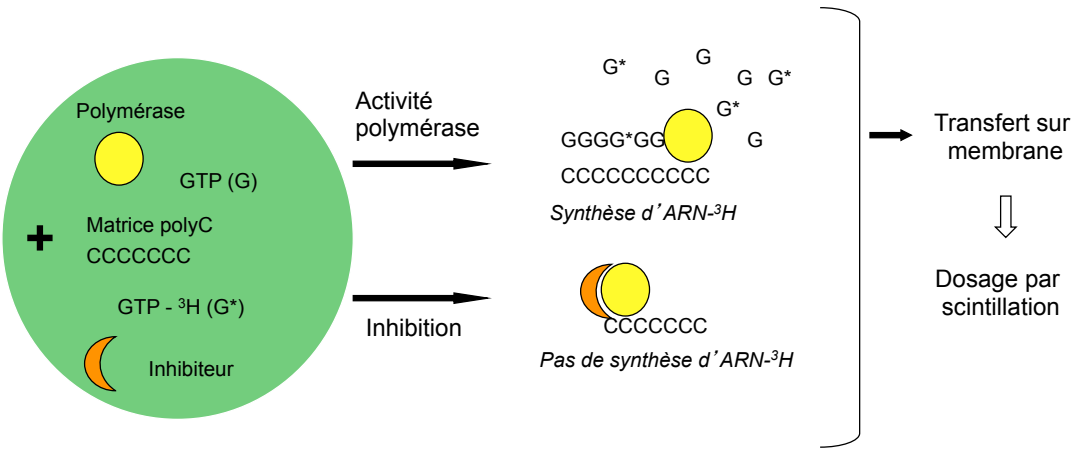



**Figure 35.** Principe du test d'évaluation du potentiel inhibiteur de l'activité NS polymérase du DENV

**Tableau 1.** Espèces néo-calédoniennes présentant un % d'inhibition > à 70 % à 10 µg $mL^{-1}$ lors du criblage sur la NS5 polymérase du DENV

| Famille | Genre | Espèce | Sous-espèce | Partie | % d'inh. |
|---|---|---|---|---|---|
| ESCALLONIACEAE | *Polyosma* | *?* | | Ecorce | 100 |
| SAPINDACEAE | *Storthocalyx* | *chryseus* | | Ecorce | 100 |
| LAURACEAE | *Cryptocarya* | *gracilis* | | Ecorce | 99 |
| LAURACEAE | *Cryptocarya* | *chartacea* | | Ecorce | 99 |
| LAURACEAE | *Cryptocarya* | *macrocarpa* | | Ecorce | 99 |
| MYRSINACEAE | *Tapeinosperma* | *robustum* | | Ecorce | 98 |
| WINTERACEAE | *Zygogynum* | *pancheri* | *arrhantum* | Ecorce | 98 |
| ELAEOCARPACEAE | *Elaeocarpus* | *speciosus* | | Ecorce | 97 |
| MYRSINACEAE | *Maesa* | *novocaledonica* | | Ecorce | 97 |
| PROTEACEAE | *Virotia* | *francii* | | Bois | 96 |
| MYRTACEAE | *Tristaniopsis* | *glauca* | | Feuille | 95 |
| MYRTACEAE | *Tristaniopsis* | *yateensis* | | Ecorce | 94 |
| FAGACEAE | *Nothofagus* | *balansae* | | Ecorce | 93 |
| WINTERACEAE | *Zygogynum* | *pancheri* | *pancheri* | Ecorce | 91 |
| WINTERACEAE | *Zygogynum* | *pomiferum* | *pomiferum* | Ecorce | 83 |
| LAURACEAE | *Litsea* | *triflora* | | Feuille | 79 |
| DILLENIACEAE | *Hibbertia* | *lanceolata* | | Ecorce | 78 |
| EUPHORBIACEAE | *Trigonostemon* | *cherrieri* | | Ecorce | 76 |
| WINTERACEAE | *Zygogynum* | *tieghemii* | *tieghemii* | Ecorce,Tige | 75 |
| WINTERACEAE | *Zygogynum* | *acsmithii* | | Ecorce,Tige | 75 |
| APOCYNACEAE | *Alstonia* | *legouixiae* | | Ecorce | 70 |

de nucléotides tritiés. Par la suite, le contenu des puits est transféré sur membrane, rincé, puis dosé par scintillation. La radioactivité quantifiée est inversement proportionnelle au potentiel d'inhibition des molécules ou de l'extrait évalué. Le protocole détaillé de l'essai biologique est décrit dans la partie expérimentale, page 263.

Après un criblage initial mené sur 650 plantes néo-calédoniennes, 21 d'entre elles présentent un % d'inhibition $>$ à 70 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$. Le tableau 1 présente ces 21 plantes, en grisé les deux espèces sélectionnées pour cette étude.

## 3. ESSAI BIOLOGIQUE RDRP NS5 POLYMÉRASE UTILISÉ DANS CETTE ÉTUDE

# Conclusion et présentation du projet

La dengue est une maladie virale qui concerne presque 40 % de la population mondiale. Si l'infection n'est pas toujours mortelle, les conséquences socio-économiques des épidémies peuvent-être très importantes. Depuis la moitié du XX$^{e}$ siècle, on assiste à une véritable explosion épidémiologique de cette arbovirose. Les zones susceptibles d'être exposées à la dengue sont directement liées à l'aire de répartition des vecteurs (*A. aegypti* et *A. albopictus*). Les possibilités de réchauffement climatique global associées aux mouvements de population laissent présager d'une expansion possible de l'aire de répartition du DENV vers les pays de l'hémisphère nord.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun vaccin ou traitement antiviral chimiothérapeutique contre le DENV. De gros efforts sont faits pour développer un vaccin contre le DENV. Mais les vaccins sont coûteux à la fabrication et souvent sensibles aux conditions de températures et d'humidité rencontrées dans les pays de la zone intertropicale. La recherche et le développement de molécules inhibitrices du DENV apparait donc comme une nécessité. Parmi les cibles enzymatiques connues, l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5 du DENV apparait comme une cible thérapeutique de choix. C'est en effet la protéine la plus conservée des Flaviviridae, laissant espérer la découverte éventuelle d'inhibiteurs à large spectre d'action et diminuent les possibilités de mutations et donc de résistances aux traitements. D'autre part, cette enzyme n'a pas d'équivalent humain ce qui confère une certaine innocuité à des inhibiteurs potentiels. Il n'existe actuellement qu'une seule classe d'inhibiteurs allostériques de la NS5 polymérase du DENV : les dérivés de l'acide *N*-sulfonylanthranilique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectif principal la découverte de nouveaux inhibiteurs de la NS5 polymérase du virus de la dengue à partir de la

biodiversité néo-calédonienne.

Un criblage préliminaire a été réalisé sur 1350 extraits provenant de 650 plantes de Nouvelle-Calédonie en utilisant la NS5 polymérase du DENV comme cible biologique. Parmi les 15 meilleurs candidats, plusieurs espèces de *Cryptocarya* ont montré une bonne inhibition de la protéine. L'extrait AcOEt des écorces de *Cryptocarya chartacea* (Lauraceae) a montré une des meilleures activités (99 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$). Bien que moins actif (76 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$), l'espèce *Trigonostemon cherrieri* (Euphorbiaceae) a été sélectionnée en vue de son étude phytochimique, en raison de critères chimiotaxonomiques intéressants.

Ces deux plantes ont donc été sélectionnées dans le but d'isoler de nouveaux inhibiteurs potentiels de la NS5 polymérase du DENV, d'établir leur structure moléculaire et de caractériser leurs propriétés biologiques.

Deuxième partie

# *Cryptocarya chartacea* : Étude chimique et activités biologiques

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude de la première plante travaillée au cours de mes travaux de thèse : *Cryptocarya chartacea* Kostermans. Cette espèce, endémique de Nouvelle-Calédonie, a été sélectionnée pour le fort pourcentage d'inhibition (99 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$) de son extrait AcOEt d'écorces sur la NS5 polymérase du DENV.

Le premier chapitre est constitué par l'étude bibliographique menée sur le genre *Cryptocarya*. Après avoir décrit les caractéristiques de la famille (Lauraceae) et du genre, nous évoquerons certains des métabolites secondaires isolés de *Cryptocarya* et leurs activités biologiques.

Dans le second chapitre seront présenté les travaux personnels menés sur *Cryptocarya chartacea*. L'isolement et la caractérisation structurale d'une série de nouvelles flavanones 6-mono et 6,8-dialkylées seront décrits dans l'étude phytochimique. Nous mettrons l'accent sur l'étude de configuration absolue des chartacéones A1-A4 (**55-58**) qui a été basée sur le calcul théorique des spectres de dichroïsme circulaire de ces composés. Nous rapportons également les activités inhibitrices des chartacéones vis-à-vis de la polymérase du virus de la dengue à la fin de ce chapitre.

# Chapitre 1

# Étude bibliographique

**Plan**


1.1 La famille des Lauraceae . . . . . **59**
1.1.1 Classification des Lauraceae . . . . . 59
1.1.2 Répartition géographique . . . . . 60
1.1.3 Critères de reconnaissance . . . . . 61
1.1.4 Intérêt économique et utilisations traditionnelles . . . . . 62
1.2 Le genre *Cryptocarya* et l'espèce *Cryptocarya chartacea* . . . . . **63**
1.2.1 Description botanique . . . . . 63
1.2.2 Répartition géographique . . . . . 65
1.2.3 Intérêt économique et utilisations traditionnelles . . . . . 65
1.3 Composition chimique du genre *Cryptocarya* . . . . . **67**
1.3.1 Alcaloïdes . . . . . 67
1.3.2 $\alpha$-pyrones . . . . . 70
1.3.3 Flavanones complexes . . . . . 72


## 1.1 La famille des Lauraceae

### 1.1.1 Classification des Lauraceae

Les Lauraceae appartiennent à l'ordre des Laurales qui renferme 9 familles et environ 3 000 espèces. Les principales familles sont les Calycanthaceae, les Lauraceae, les Monimiaceae et les Chloranthaceae. L'ordre est habituellement considéré comme faisant partie du complexe des Magnoliidées.

Les Lauraceae sont traditionnellement divisées en deux sous-familles : les Cassythoideae représentés principalement par le genre *Cassytha*, caractérisé par son port grimpant et son parasitisme et les Lauroïdeae, sous-famille hétérogène et probablement paraphylétique qui comprend tous les autres genres.

Divers caractères ont été invoqués pour des regroupements taxonomiques à l'intérieur des « Lauroideae ». Sans matériel florifère et fructifère, la détermination des genres et des espèces est très difficile.

- l'anatomie du bois
- le nombre d'étamines
- la disposition et le nombre de loges de l'anthère
- la persistance et la forme des tépales
- la morphologie du fruit et de la cupule
- la structure de l'inflorescence

Trois tribus sont habituellement reconnues.

**Les Laureae** ont des inflorescences apparemment racémeuses ou ombellées, munies d'un involucre de bractées et les anthères intorses dans le troisième verticille d'étamines, elles comprennent *Litsea, Lindera, Laurus, Sassafras* et *Umbellularia.*

**Les Perseeae** , avec *Ocotea, Nactandra, Licaria, Persea, Phoebe* et *Cinnamomum*, ont des inflorescences cymeuses, dépourvues d'involucre de bractées et des anthères extrorses dans le troisième verticille d'étamines.

**Les Cryptocaryeae** enfin, avec *Cryptocarya*, *Beilschmiedia* et *Endiandra*, comprennent des plantes semblables aux *Persea* mais, dans leurs inflorescences, les fleurs latérales des cymes triflores unitaires ne sont pas tout à fait opposées.

La famille des Lauraceae est relativement peu spécialisée et se situe, d'un point de vue phylogénétique, proche des Monimiaceae et peu éloignée des Magnoliaceae. Il s'agit donc, dans l'évolution des espèces, d'une famille relativement primitive.[100,101]

### 1.1.2 Répartition géographique

La plupart des individus de la famille des Lauraceae se trouvent dans les régions tropicales et subtropicales. On les retrouve exceptionnellement dans des zones de climat

100. Judd, W. S. et al., *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*, De Boek, 2001.
101. Wiart, C., *Medicinal plants of Southeast Asia*; Publications, P., éd., 2000.

tempéré comme le Chili (*Persea lingue* Nees) ou le sud du Canada (*Lindera benzoin* Meissn.). Une autres espèce commune qui se retrouve sous nos latitudes est le laurier noble ou laurier sauce (*Laurus nobilis* L.).

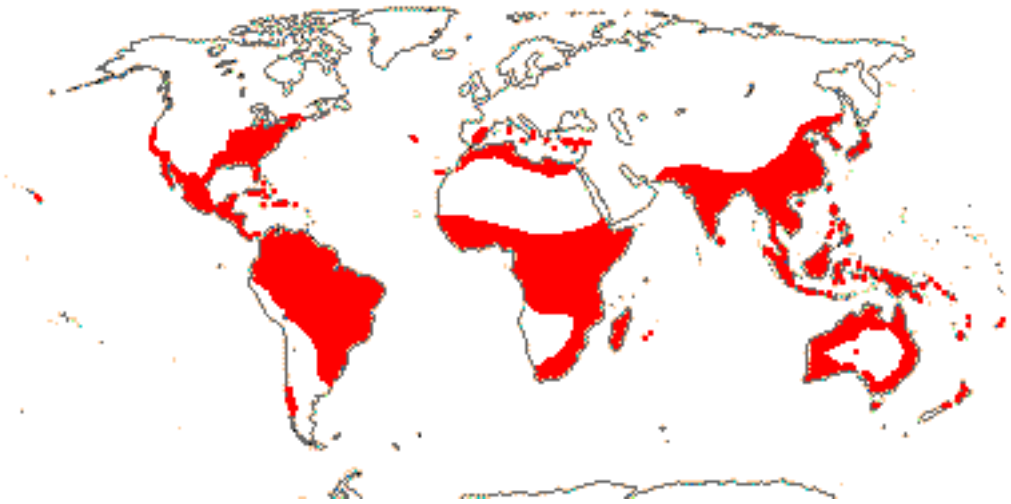


**Figure 36.** Répartition mondiale des Lauraceae [1]

### 1.1.3 Critères de reconnaissance

Arbres ou buissons, ou plante grimpante parasite (*Cassytha*) ; *nœuds unilacunaires ; à cellules sphériques dispersées contenant des huiles essentielles (terpénoïdes, aromatiques)* ; habituellement à tanins ; généralement à alcaloïdes benzyl-isoquinoléïques et/ou de type aporphine. Feuilles alternes et spiralées, rarement opposées, *mais jamais distiques,* simples, rarement lobées, entières à nervation généralement pennée, ou parfois à paire inférieure de nervures secondaires plus importante, arquées vers le sommet de la feuille et la nervation devenant alors palmée, toutes les nervures bien évidentes et reliées aux faces adaxiales et abaxiales par des tissus lignifiés, limbe *à points translucides; stipules absentes.* Inflorescences déterminées à apparemment indéterminées, axillaires. *Fleurs* hermaphrodites ou unisexuées (alors plantes plus ou moins dioïques), actinomorphes, *à réceptacle concave caractéristique*, habituellement petites vert pale, blanches ou jaunes. *Tépales généralement 6,* libres ou légèrement soudés, imbriqués. *Étamines généralement 3-12 ; filets souvent munis à la base ou latéralement de paires d'appendices* (staminodes) *à nectar ou odoriférants,* les trois étamines internes souvent

1. `http://www.mobot.org` (consulté le 01/10/2011)

réduites aux staminodes a nectar ou odoriférants ; *anthères déhiscentes par 2 ou 4 clapets qui s'ouvrent à partir de la base en expulsant vers le haut le pollen visqueux,* souvent dimorphes ; grains de pollens sans aperture, à exine réduite à des fines épines. Carpelle 1; *ovaire supère, à placentation plus ou moins apicale* ; stigmate 1, capité, tronqué, lobé ou étiré. Ovule 1. Fruit : drupe ou rarement une baie, *souvent accompagné d'un réceptacle persistant charnu ou lignifié (et parfois aussi des tépales) qui montre souvent un contraste de couleur avec le fruit (formant une cupule);* embryon volumineux, à cotylédons charnus; albumen absent.[100]

### 1.1.4 Intérêt économique et utilisations traditionnelles

L'Homme a trouvé chez les Lauraceae une source de **bois de construction** (itaùba ou bois de pierre ex *Mezilaurus itauba* (Meissn.) Taub. et canela-tapinhoa ex *M. navalium* (Fr. Allem.) Taub. du Brésil, stink-wood ex *Ocotea bullata* E. Mey. d'Afrique du Sud, nan-mu ex *Persea nanmu* Oliv. de Chine, bois de fer ex *Eusideroxylon zwageri* T. et B. d'Indonésie). Cette famille est également une source de **fruits comestibles** (l'avocat ou *Persea americana* Miller d'Amérique du Sud); de **graisses végétales** (beurre de tangallak de *Litsea sebifera* Pers. d'Indochine); d'**épices** (canelle ex *Cinnamomum zeylanicum* Nees du Sri-Lanka, cassia ex *C. cassia* Blume de Chine, sassafras ex *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees d'Amérique du Nord) et d'**huiles essentielles** (bois de rose ex *Aniba duckei* Kosterm. du Brésil et *A. rosaeodora* Ducke de Guyane française. En **médecine traditionnelle** les espèces suivantes sont utilisées : *Aniba coto* (Rusby) Kosterm., *A. pseudocoto* (Rusby) Kosterm. en Bolivie; *Ocotea rodiaei* (Shomb.) Mez en Guyane; *Lyndera strychnifolia* Vill. en Chine et le camphrier ex *Cinnamomum camphora* Sieb. à Taïwan, en Chine et au Japon.

La recherche de ces produits a été pressante de tout temps. La recherche de l'arbre à cannelle, probablement *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez, aurait ainsi motivé l'expédition de soldats espagnols depuis les Andes jusqu'à l'estuaire de l'Amazone vers 1540.[102]

La surexploitation humaine a conduit à une quasi-extinction de certaines espèces de Lauraceae comme par exemple, *Nectandra utilis* Rowher coupé pour son bois au Pérou [1] ou encore *Ocotea bullata* E. Mey. dont l'écorce est employée en médecine traditionnelle dans la région du KwaZulu-Natal en Afrique du Sud.[103]

102. Gottlieb, O. *Phytochemistry*, **1972**, *11* 1537–1570.
1. http://www.iucnredlist.org/
103. Zschocke, S ; Van Staden, J. *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, *71* 473–478.

## 1.2 Le genre *Cryptocarya* et l'espèce *Cryptocarya chartacea*

L'étymologie du mot *Cryptocarya* renseigne sur la morphologie caractéristique de leurs fruits. En effet en grec, KPΨΠTOΣ signifie *caché* et KAPΨON signifie *noyau*. Le fruit des *Cryptocarya* est entièrement inclus dans le périanthe accrescent qui ne laisse qu'une minuscule ouverture à l'extrémité. Cf. illustration en 15 et 16 de la figure 37.

### 1.2.1 Description botanique

#### 1.2.1.1 Genre *Cryptocarya*

**Arbres** ou arbustes. Bouton terminal sans écailles protectrices, les feuilles non développées recourbées comme des griffes d'oiseau. Rameaux d'ordinaires pourvu de nombreuses petites lenticelles. **Feuilles** (en Nouvelle-Calédonie) en spirale, entières penni- ou triplinerves. **Panicules** axillaires, généralement groupées en grande panicule terminale à feuilles un peu réduites. **Fleurs** habituellement sessiles, hermaphrodites, à tube grêle, cylindrique ou urcéolé, rétréci au sommet, à 6 tépales égaux en deux rangs, généralement dressés. **Etamines** fertiles (en Nouvelle-Calédonie) d'ordinaires 9 en 3 rangs, à anthères à 2 loges, le connectif en pointe dépassant des loges. Loges des 6 anthères externes introrses, les 3 étamines internes extrorses. Filets bien développés, ceux des 3 étamines internes à deux glandes basilaires de chaque cotés. Staminodes du $4^{eme}$ rang ovales ou cordés, assez grands et d'ordinaire à long acumen (en Nouvelle-Calédonie). **Ovaire** grêle, long, atténué en style grêle et long, à stigmate presque distinct, capitellé. Fruit complètement inclus dans le tube floral accrescent, ne laissant qu'un petit trou au sommet. **Fruit** lisse ou à côtes, noirs, luisants,globuleux, ellipsoïdes, ovoïdes, coniques, ou transversalement ellipsoïdes et plus ou moins réniformes.[104]

#### 1.2.1.2 Espèce *Cryptocarya chartacea* Kostermans

*Cryptocarya chartacea* Kostermans est un arbre de 10 à 15 m. En plus des caractéristiques du genre *Cryptocarya*, on le différencie par la texture cartonnée spéciale de ses feuilles que l'on qualifie de chartacées, d'où le nom donné à l'espèce. Voir photo 38

104. Kostermans, A. J. G. H., *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Lauracées* ; Le Muséum National d'Histoire Naturelle : 1974.

PL. 11. — **Cryptocarya longifolia** Kosterm. : ***1***, rameau fleuri; ***2***. fl. en demi-coupe; ***2'***, pilosité du calice; ***3***, ***3'***, ***3"***, étamine cycles I et II, vues int., ext., profil; ***4***, ***4'***, ***4"***, étamine cycle III, mêmes vues; ***5***, ***5'***, ***5"'*** staminode cycle IV *(Hürlimann 1440)*; ***6***. rameau fruct.; ***7***. coupe d'un fruit; ***7'***. gemmule *(MacKee 12519)*. — **C. mackeei** Kosterm. : ***8***. feuille et jeune pousse florifère; ***9***. inflorescence jeune; ***10***, ***10'***. fl. et sa coupe; ***11***, ***11'***, ***11"***, étamine cycles I et II, vues int., ext. et profil; ***12***, ***12'***, ***12"***. étamine cycle III, mêmes vues; ***13***, ***13'***, ***13"***. staminode cycle IV *(MacKee 17835)*; ***14***, feuille et reste d'infrut.; ***15***. fr. vu dessus; ***16***, ***16'***, coupe du fr. dans des plans perpendiculaires; ***17***, gemmule velue *(MacKee 17889)*.

**Figure 37. Planche botanique de parties de *Cryptocarya longifolia* et *C. mackeei*** - on peut noter les fruits caractéristiques en 15 et 16

**Figure 38. Photo des feuilles de *Cryptocarya chartacea*** - photo : Marc Litaudon

### 1.2.2 Répartition géographique

Le genre *Cryptocarya* est un genre pantropical, d'environ 350 espèces répandu surtout en Malaisie, en Nouvelle-Guinée mais peu en Amérique du Sud et en Afrique du Sud (absent de l'Afrique équatoriale). Il est bien représenté à Madagascar. Ces espèces dominent souvent dans la strate forestière inférieure. Les espèces *C. alba* (Chili), *C. erythroxylon* et *C. foveolata* (Australie, montagnes du South Wales) sont exceptionnelles au sein du genre pour leur tolérance au gel, la majorité des représentants étant de climat tropical [1].

*Cryptocarya chartacea* Kosterm. est endémique de Nouvelle-Calédonie. Dans la « grande-terre »principale, on le retrouve dans la forêt dense humide sempervirente et dans la forêt sclérophylle.[8] Voir carte 39

### 1.2.3 Intérêt économique et utilisations traditionnelles

Le fruit de l'espèce chilienne *C. alba* est comestible, son écorce est utilisée pour tanner le cuir et pour faire des teintures de coloration orange [2]. L'huile essentielle de

1. `http://en.wikipedia.org/wiki/Cryptocarya`
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Cryptocarya_alba

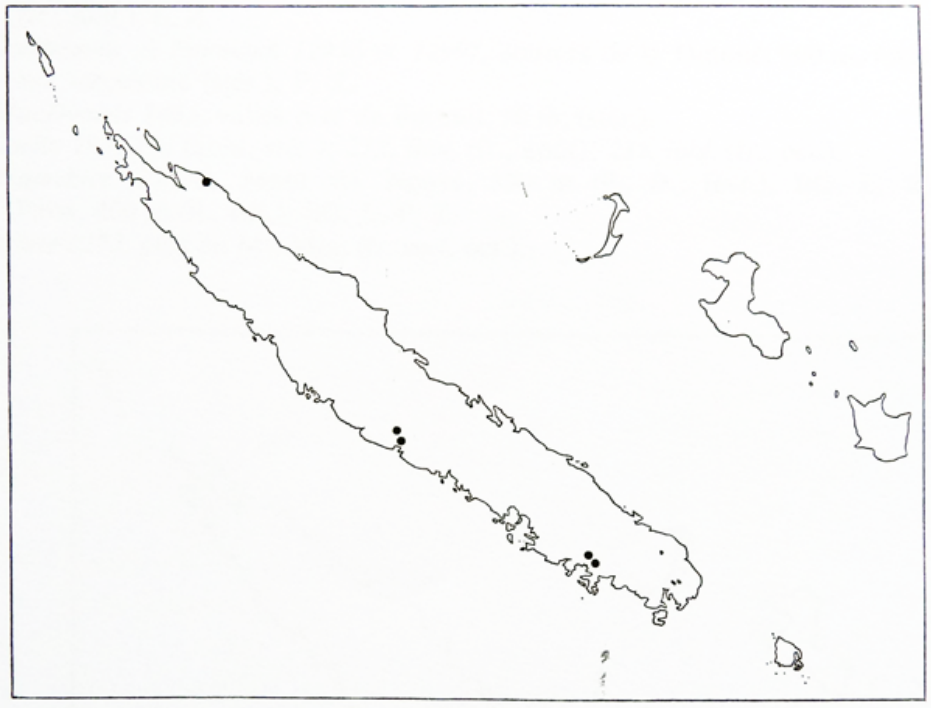


**Figure 39.** Répartition de *Cryptocarya chartacea* Kosterm.[104]

l'espèce indonésienne *C. massoia* est employée pour son odeur (douce, rappelant l'arôme de coco) en tant qu'additif alimentaire et en cosmétique. Les $\alpha$-pyrones de type massoialactones sont responsables de ses propriétés odoriférantes. En médecine traditionnelle, l'écorce de *C. massoia* entre dans la composition du « *Jamu sehat wanita* » indonésien, une préparation incorporant plusieurs plantes qui est prescrite aux femmes venant d'accoucher.[105] Les fruits de *C. moschata* sont utilisés comme épices (« muscade brésilienne »). Certaines espèces vietnamiennes sont utilisées pour la construction des maisons (*C. concinna, C. lenticellata, C. ferrea, C. mecalfina*) ou des ponts et des bateaux pour leurs bois résistants aux insectes et termites.

Actuellement, les guérisseurs traditionnels Zulu du Kwazulu-Natal en Afrique du Sud emploient l'écorce de tronc de deux espèces de *Cryptocarya* (*C. latifolia et C. myrtifolia*) en substitution de celle d'*Ocotea bullata*, l'utilisation massive de ce dernier ayant induit sa raréfaction. L'écorce d'*Ocotea bullata* est employée de façon traditionnelle comme remède contre les maux de têtes, maux de dos et autres douleurs.[106] Des

105. Sangat, H. M. ; Larashati, I. *Biodiversitas*, **2002**, *3* 231–235.
106. Sehlapelo, B. ; Drewes, S. *Phytochemistry*, **1993**, *32* 1352–1353.

propriétés d'inhibition des cyclooxygénases (COX) de type 1 et 2 ont été trouvées pour les écorces de cette espèce.[107] Une équipe sud-africaine a donc mené une investigation pharmacologique sur des extraits d'écorces de différents *Cryptocarya* sud africains pour évaluer et comparer les pouvoir inhibiteurs des COX 1 et 2 avec celui d'*Ocotea bullata* : tous ont montré une activité antagoniste encore meilleure. L'écorce de *C. woodi* a même montré une très bonne sélectivité COX 1/COX 2 dans son inhibition.[103] Malheureusement aucun métabolite commun au deux genres et actif sur les COX n'a pu être isolé.

En Nouvelle-Calédonie, la seule espèce de *Cryptocarya* pour laquelle une utilisation traditionnelle ait été rapportée est *Cryptocarya odorata* (Panch. et Séb.) Guillaum. Cette espèce renferme dans ses feuilles une essence à odeur citronnée, d'où son nom local de « fausse citronelle ». Appelée « *kwèmôrö* » dans le sud de l'île, la décoction d'écorces est employée en usage externe en tant qu'antihémorragique et cicatrisant. Associée à *Hernandia cordigera* et *Elaeocarpus persicaefolius*, l'écorce entre dans la composition d'un remède vomitif et contre-poison.[10]

## 1.3 Composition chimique du genre *Cryptocarya*

Depuis le début des années 50, une trentaine d'espèces de *Cryptocarya* ont fait l'objet de travaux phytochimiques. Globalement, l'ensemble de ces travaux permettent de mettre en évidence trois grandes classes de métabolites secondaires chez les *Cryptocarya* : les **alcaloïdes** et les **$\alpha$-pyrones** fréquemment observés dans ce genre mais également présents chez l'ensemble des Lauraceae et les **flavonoïdes** qui semblent plus spécifiques des *Cryptocarya*.

Pour ces trois grandes classes de composés, on donnera quelques exemples des métabolites isolés du genre. Les activités biologiques de ces composés seront résumées dans un tableau final. La partie consacrée aux flavonoïdes complexes de *Cryptocarya* sera, quant à elle, davantage détaillée.

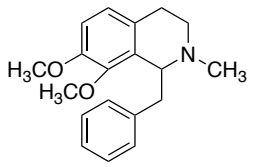
### 1.3.1 Alcaloïdes

Plus d'une cinquantaine d'alcaloïdes différents a été rapportée pour le genre *Cryptocarya*. Certains font preuve de propriétés pharmacologiques tout à fait intéressantes.

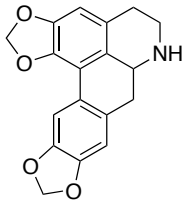
107. Zschocke, S et al. *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, *71* 219–30.

Comme chez la plupart des Lauraceae, les alcaloïdes isolés du genre *Cryptocarya* sont dérivés du squelette benzyltétrahydroisoquinoléique. A partir de ce squelette de base seront formés des alcaloïdes plus complexes de type aporphine, pavine ou encore dibenzo-pyrrocoline.[102]

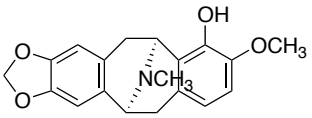
La longifolidine (**27**) isolée de *Cryptocarya longifolia*[108] est un exemple de benzyltétrahydroisoquinoléine simple. Dans la catégorie des aporphinoïdes, on pourra citer la cryptodorine (**28**) isolée des écorces de tronc de *Cryptocarya odorata*.[109]




Longifolidine (**27**)




Cryptodorine (**28**)



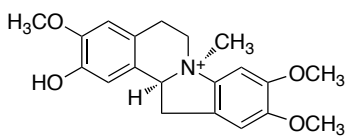

Néocaryachine (**29**)

Les benzyltétrahydroisoquinoléines conduisent également aux alcaloïdes de type pavine. Ce type d'alcaloïde est présent dans seulement quatre familles de plantes (Papaveraceae, Berberidaceae, Lauraceae et Ranunculaceae). Dans ces familles, ces structures ont été isolées d'un faible nombre de genres. Ainsi, au sein des Lauraceae, ils sont présents uniquement chez les *Cryptocarya*. La néocaryachine (**29**) a été isolée des écorces de *C. chinensis*, un *Cryptocarya* de Taïwan et du Sud Est de la Chine.[110]

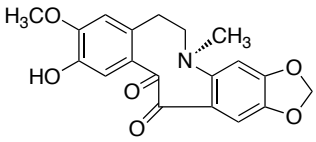
Parmi les dérivés de benzyltétrahydroisoquinoléine, les alcaloïdes de type dibenzopyrrocoline sont sans aucun doute les plus originaux. Ils ont été décrits pour la première fois chez *C. bowiei* (Hook.) Druce[111] et depuis n'ont été retrouvés que dans deux autres genre : *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon (Lauraceae)[112] et chez *Manglietia chingii* Dandy (Magnoliaceae)[113].

Les premiers composés de ce type sont isolés de l'écorce de *C.bowiei*, il s'agit d'alcaloïdes quaternaires comme la cryptaustoline (**30**).[114] En 1989, Leboeuf et al. isolent

108. Bick, I. et al. *Aust. J. Chem.*, **1981**, *34* 477–481.
109. Bick, I. et al. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, *12* 4596–4597.
110. Lee, S.-S. et al. *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53* 1267–1271.
111. Ewing, J. et al. *Nature*, **1952**, *169* 618–619.
112. Lee, S.-S. et al. *J. Nat. Prod.*, **1996**, *59* 80–82.
113. Qiu, S et al. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39* 4167–4170.
114. Ewing, J et al. *Aust. J. Chem.*, **1953**, *6* 78.

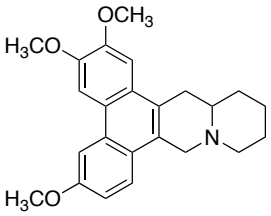



Cryptaustoline (**30**)

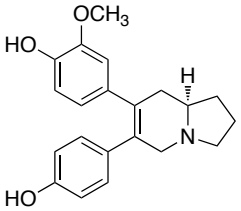



Oubatchensine (**31**)

d'autres dibenzo-pyrrocoline chez *C. phyllostemon* et *C. oubatchensis*.[115] Plus récemment, et toujours chez *C. oubatchensis*, un composé de type *seco*-dibenzopyrrocoline a été isolé. L'oubatchensine (**31**) est le premier membre d'une nouvelle classe d'alcaloïdes.[116]




Cryptopleurine (**32**)




Phyllostemine (**33**)

Les alcaloïdes de type phénantroquinolizidine comme la cryptopleurine (**32**) isolée de *C. pleurosperma* en 1948[117] et *séco*-phénantroindolizidine comme la phyllostemine (**33**) isolée de *C. phyllostemon*[115] constituent une autre classe d'alcaloïdes caractéristiques des *Cryptocarya*.

Le tableau 2, résume quelques activités biologiques relevées pour des alcaloïdes isolés du genre *Cryptocarya*. Du point de vue biologique, les dérivés de type phénantroquinolizidine (cryptopleurine (**32**)) et phénantroindolizidine (antofine) sont les plus intéressants. Ces dérivés présentent en effet une cytotoxicité comparable aux cytostatiques modernes ($CI_{50}$ de l'ordre du nanomolaire), et sont, de plus, toxiques vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses multirésistantes.[130] Cependant des effets secondaires trop importants au niveau du système nerveux central rendent nécessaire le ciblage des cellules cancéreuses, soit par des méthodes de délivrance tissus-dépendantes, soit en synthétisant des analogues plus polaires.[127]

115. Lebœuf, M. et al. *Can. J. Chem.*, **1989**, *67* 947–952.
116. Toribio, A. et al. *Org. Lett.*, **2006**, *8* 3825–3828.
117. Lande, I. S. De la *Aust. J. Exp. Biol. Med.*, **1948**, *26* 181–7.
130. Min, H.-Y. et al. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80* 1356–64.
127. Yang, X. et al. *Organic Letters*, **2010**, *12* 1416–9.

**Tableau 2.** Activités biologiques de quelques alcaloïdes présents dans le genre *Cryptocarya*

| Espèce | Composé | Activité biologique | Ref. |
|---|---|---|---|
| | **Benzyltétrahydroisoquinoléïnes** | | |
| *C.longifolia* [108] | réticuline | hypotensif, vasorelaxant | [118] |
| *C.crassinervia* [119] | | anticoagulant | [120] |
| *C.odorata* [109] | | action neuroleptique | [121] |
| | **Aporphinoïdes** | | |
| *C. longifolia* [108] | laurotétanine | anticoagulant | [120] |
| | norisocorydine | action antinociceptive | [122] |
| *C. longifolia* [108] | N-methyl laurotétanine | antiviral (Poliovirus) | [123] |
| *C.odorata* [109] | | agoniste sérotoninergique ($5HT_{1A}$) | [124] |
| | **Pavines** | | |
| *C. chinensis* [110] | caryachine | antiarytmique | [125, 126] |
| | **Phénantro-quinolizidines (-indolizidines)** | | |
| *C. pleurosperma* [117] | cryptopleurine | cytotoxique puissant | [127] |
| *C. phyllostemon* [115] | antofine | cytotoxique puissant | [128] |
| | | antiviral (Mosaïque du Tabac) | [129] |

### 1.3.2 $\alpha$-pyrones

Les $\alpha$-pyrones ou styryl-pyrones sont parfois appelées kawa-lactones. En effet ces $\alpha$-pyrones sont les constituants principaux du kawa, une boisson préparée à partir des rhizomes du poivre inébriant *Piper methysticum* (Piperaceae). Cette préparation, consommée dans les îles Polynésiennes depuis des siècles, induit une sensation de bien-être. Les constituants actifs de la drogue sont des $\alpha$-pyrones *mono-* ou *bis-* insaturées avec, entre autres, la kawaïne.[131]

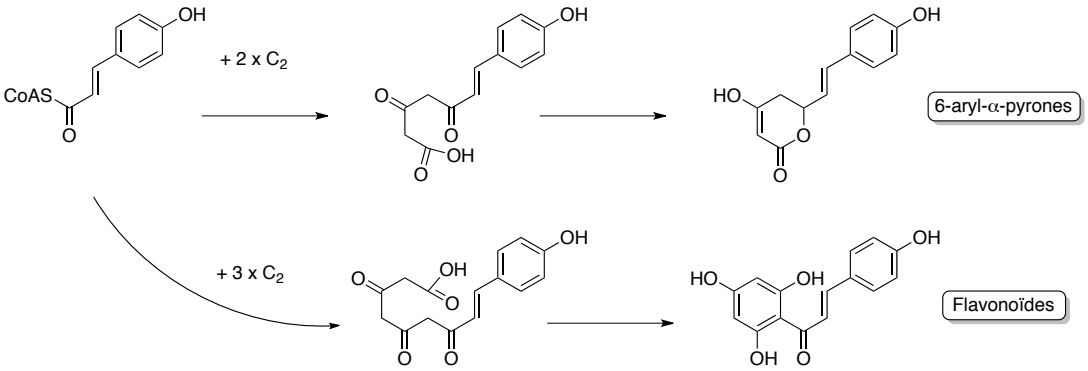
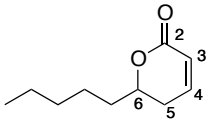



**Figure 47.** Biogénèse des $\alpha$-pyrones et flavonoïdes[131]

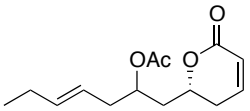
131. Bruneton, J., *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*; Doc, E. T. ., internationales, E. médicales, éds.; Lavoisier : 2009.

Biogénétiquement, les 6-aryl-$\alpha$-pyrones sont issues de la voie shikimique. L'allongement des composés de type Ar-$C_3$ par additions successives d'unités dicarbonées est un processus fréquent chez les végétaux : il est à l'origine des 6-aryl-$\alpha$-pyrones (Ar-$C_3$ + 2x$C_2$) mais aussi des flavonoïdes (Ar-$C_3$ + 3x$C_2$). Le mécanisme d'addition des unités dicarbonées sur la chaîne latérale des acides cinnamiques est tout-à-fait similaire au processus d'allongement des polyacétates : la molécule initiatrice est convertie en acyl-CoA de l'acide hydroxycinnamique et les éléments dicarbonés sont apportés sous forme activée de malonyl-coenzyme A.[131] (47).

Chez les *Cryptocarya* on retrouve essentiellement des $\alpha$-pyrones mono-insaturées : les 5,6-dihydro-$\alpha$-pyrones. Ces composés possèdent un cycle $\delta$-lactonique $\alpha$,$\beta$-insaturé avec un substituant alkyle, alkényle ou aryle en position 6.



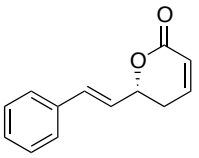

Massoïalactone (**34**)



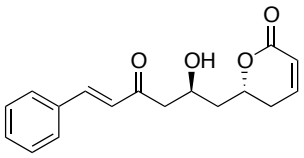

Alkényle-lactone (**35**)

• Substituant alkyle : la massoïalactone (**34**) a été isolée de *C. massoia*, un *Cryptocarya* utilisé en médecine traditionnelle en Nouvelle Guinée.[132]

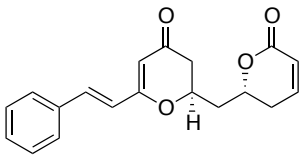
• Substituant alkényle : une seule molécule appartenant à cette classe a été reportée dans la littérature. Il s'agit d'un métabolite (**35**) isolé de *C. latifolia*.[133]




Goniothalamine (**36**)




Kurzilactone (**37**)




Obolactone (**38**)

• Substituant aryle : c'est dans ce troisième groupe que l'on retrouve la majorité des $\alpha$-pyrones du *Cryptocarya*. La goniothalamine (**36**), qui n'est pas vraiment spécifique du genre, a ainsi été retrouvée chez *C. caloneura* (Scheff.) Kostermans[134] et chez *C.wyliei*.[135] La kurzilactone (**37**), isolée de l'espèce malaisienne *C. kurzii* Hf. K.[136], pos-

132. Cavill, G. W. K. et al. *Aust. J. Chem.*, **1968**, *21* 2819–2823.
133. Siegfried E, D. et al. *Phytochemistry*, **1996**, *41* 333–334.
134. Hlubucek, J. R. ; Robertson, A. V. *Aust. J. Chem.*, **1967**, *20* 2199–2206.
135. Drewes, S. et al. *Phytochemistry*, **1995**, *40* 321–323.
136. Fu, T. et al. *Phytochemistry*, **1993**, *33* 1272–1274.

sède une chaîne latérale à six carbones (stéréochimie en C-6 corrigée après comparaison avec le composé de synthèse[137]). Cette chaîne latérale peut s'étendre et comporter de huit carbones, comme pour la cryptofolione (isolée de *C.latifolia* et de *C.myrtifolia*),[138] à dix carbones comme pour la cryptomoscatone F1 isolée de l'espèce brésilienne *C. moschata*.[139] Des éthers cycliques correspondant aux molécules linéaires peuvent être formés, c'est le cas de l'obolactone (**38**) isolée de *C. obovata*.[140]

**Tableau 3.** Activités biologiques de quelques $\alpha$-pyrones de *Cryptocarya*

| Espèce | Composé | Activité biologique | Ref. |
|---|---|---|---|
| *C. latifolia* [138]<br>*C. myrtifolia*<br>*C. alba* [141] | cryptofolione | antiparasitaire (*T. cruzi*) | [141] |
| *C. obovata* | 7'-8'-déhydroobolactone | antiparasitaire (*T. brucei*) | [142] |
| *C. concinna* [143] | cryptomoscatone D2<br>*(Z)*-cryptofolione | inh. point de controle G2 | [143] |
| *C. rugulosa* [144] | rugulactone | inh. voie NF-$\kappa$B | [144] |
| *C. caloneura* [134]<br>*C. wyliei* [135] | goniothalamine | cytotoxique | [145–147] |

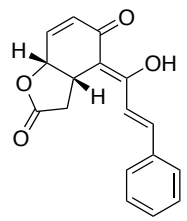
Le tableau 3 résume les propriétés biologiques relevées dans la littérature pour des $\alpha$-pyrones de *Cryptocarya*. Du point de vue pharmacologique, la goniothalamine (**36**) est une molécule tout à fait intéressante. Sa cytotoxicité s'exerce par un mécanisme pro-apoptotique qui n'est pas encore totalement élucidé. De plus, l'énantiomère synthétique *(S)* de la goniothalamine montre une excellente stéréosélectivité vis-à-vis de certaines lignées cancéreuses avec des $CI_{50}$ jusque 600 fois inférieures à celles de son énantiomère naturel *(R)* .[148]

### 1.3.3 Flavanones complexes

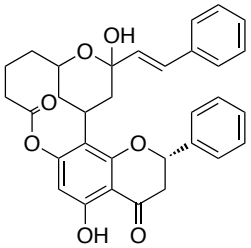
En 1972, est isolé le premier flavonoïde d'un *Cryptocarya*. C'est la cryptocaryone (**39**), une chalcone dont le cycle A est partiellement réduit. Isolée des racines de *C.bourdillonii* Gamb.[149], c'est le seul exemple de flavonoïde naturel ayant un cycle A partiellement réduit avec la ceroptine isolée de l'exsudat de *Pityrogramma triangularis* (Polypodiaceae).[150]

137. Jiang, B *Tetrahedron : Asymmetry*, **2001**, *12* 2835–2843.
138. Sehlapelo, M. B. *Phytochemistry*, **1994**, *37* 847–849.
139. Cavalheiro, A. ; Yoshida, M. *Phytochemistry*, **2000**, *53* 811–819.
140. Dumontet, V. et al. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67* 858–862.
148. Fátima, A. D. et al. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2006**, *14* 622–31.
149. Govindachari, T. ; Parthasarathy, P. *Tetrahedron Lett.*, **1972** 3419 –3420.
150. Star, A *Phytochemistry*, **1975**, *14* 2275–2278.

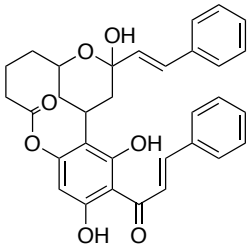
La cryptocaryone (**39**) a été par la suite retrouvée chez d'autres *Cryptocararya* (*C. konishii*[151], *C. rugulosa*[144], *C.infectoria*[152]) et *C.longifolia* (travaux personnels)).




Cryptocaryone (**39**)




Kurziflavolactone A (**40**)




Kurzichalcolactone (**41**)

En 1993, à l'ICSN, l'équipe de Thierry Sévenet isole une série de nouvelles flavanones et chalcones complexes des feuilles d'un arbre malaisien : *C. kurzii* Hook. Ce sont les kurziflavolactones (ici la kurziflavolactone A (**40**)) et la kurzichalcolactone (**41**).[153] Les kurziflavolactones sont les premiers membres d'une nouvelle classe de flavonoïdes. Il est intéressant de noter que l'équipe a également isolé de la même espèce une nouvelle $\alpha$-pyrone : la kurzilactone (**37**). Il est proposé la voie biosynthétique suivante (Fig.56 ) qui conduit aux kurziflavolactones A à D en passant par la kurzichalcolactone (**41**).

151. Kurniadewi, F. et al. *J. Nat. Med.*, **2010**, *64* 121–5.
144. Meragelman, T. L. et al. *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72* 336–9.
152. Dumontet, V. et al. *Tetrahedron*, **2001**, *57* 6189–6196.
153. Fu, X. et al. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56* 1153–1163.

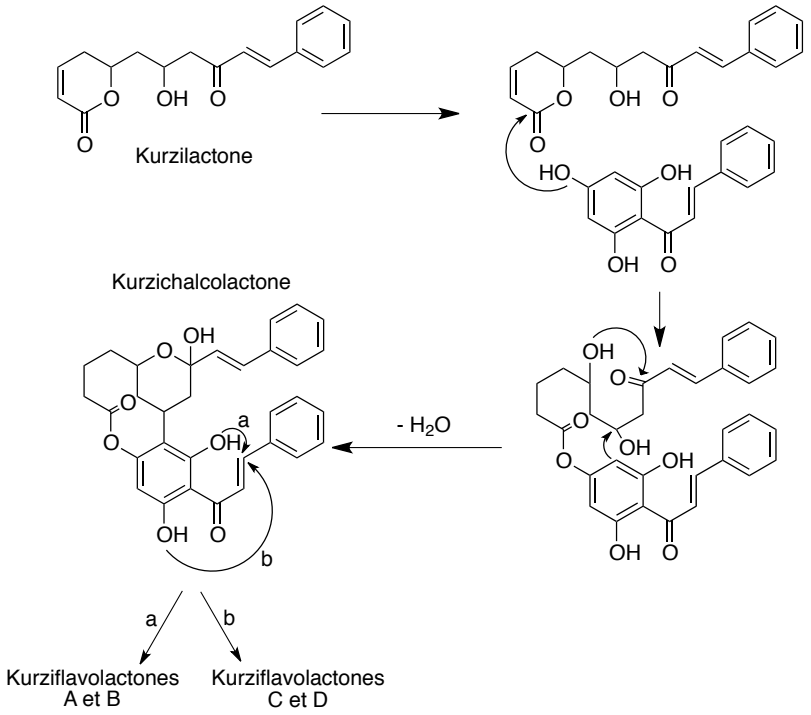
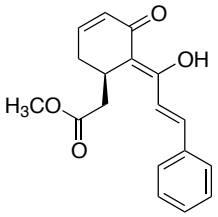
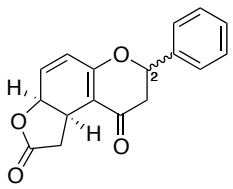



**Figure 56.** Biogénèse des kurziflavolactones de *C. kurzii*

Plus tard, toujours au sein de l'ICSN, Vincent Dumontet isole d'autres flavones et chalcones complexes de *Cryptocarya* étudiés au cours de sa thèse.[154] Ainsi, de l'écorce de tronc de *C. infectoria* (Bl.) Miq.[152], une espèce vietnamienne, il réisole la cryptocaryone (**39**) et une autre déhydro-chalcone : l'infectocaryone (**42**). Deux nouvelles flavanones réduites au niveau du cycle A sont isolées : les cryptocaryanones A (**43**) 2*(R)* et B (**44**) 2*(S)*.



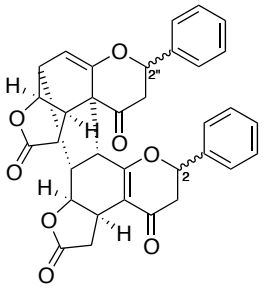
Infectocaryone (**42**)



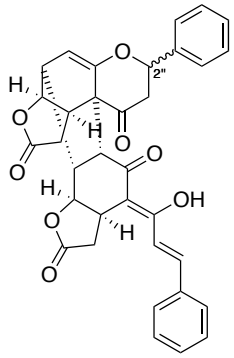
Cryptocaryanones A (**43**) et B (**44**)

154. Dumontet, V. *Etudes chimique et biologique de deux Lauraceae vietnamiennes du genre Cryptocarya : C. infectoria (Bl.) Miq. et C. obovata R. Br.* Thèse de doct., Université René Descartes Paris V, 2000.

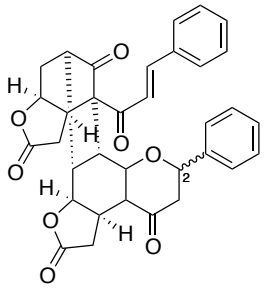
Il isole de plus quatre biflavonoïdes : les bicaryanones A-D (**45**) (A (2*(S)*,2″*(S)*), B (2*(R)*,2″*(S)*), C (2*(S)*,2″*(R)*), D (2*(R)*,2″*(R)*)) correspondant à des dimères de cryptocaryanones. Ainsi que quatre hétérodimères cryptocaryone-cryptocaryanone : les chalcocaryanones A-D (A (2″*(R)*), B (2″*(S)*), C (2*(S)*), D (2*(R)*)).



Bicaryanones A-D (**45**)

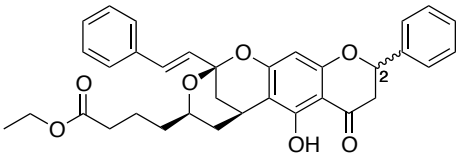


Chalcocaryanones A-B

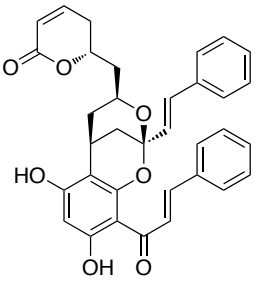


Chalcocaryanones C-D

D'un second *Cryptocarya* vietnamien, *C. obovata* R. Br., sont isolés d'autres représentants de ces flavonoïdes complexes.[140] Il les nomme oboflavanones A (2*(S)*), B (2*(R)*) et obochalcolactone (**46**).



Oboflavanones A et B



Obochalcolactone (**46**)

Ayant isolé l'obolactone (**38**) de cette même plante, il propose également une voie de biosynthèse conduisant à ces flavanones complexes à partir de la condensation d'une $\alpha$-pyrone et d'une chalcone simple. (Fig. 64)

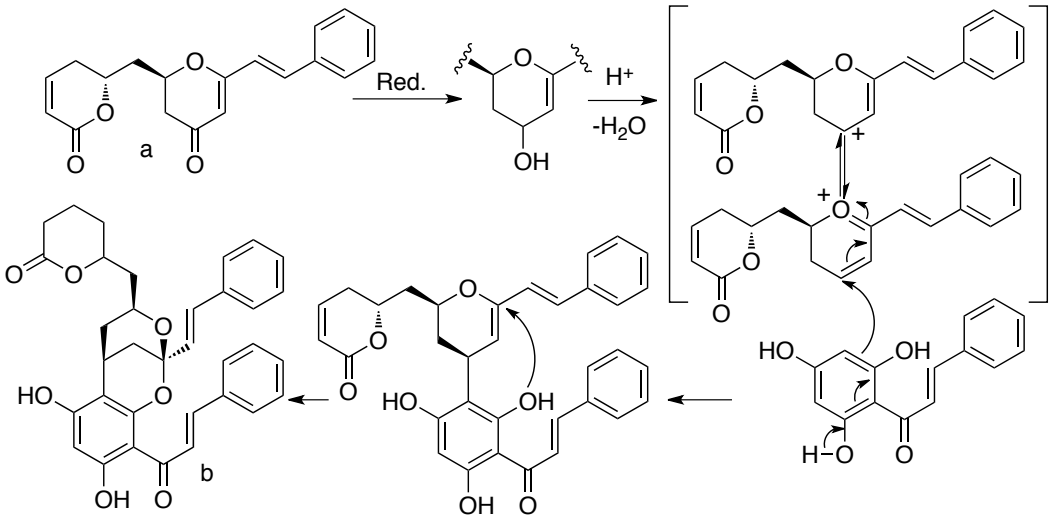
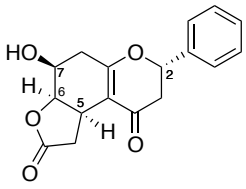



**Figure 64.** Biogénèse de l'obochalcolatone de *C. obovata*

Récemment, une équipe chinoise a isolé une série d'analogues de la cryptocaryone des feuilles de *C. chinensis*. Ce sont les **cryptochinones A** à **F**. Les différences entre elles résident dans la substitution en 7 (OH ou $OCH_3$) et dans la configuration absolue des carbones 2, 5, 6 et 7. Ici, la cryptochinone A (**47**). De cette même plante ont été isolés des flavonoïdes plus courants comme la 2($S$)-5-hydroxy-7-méthoxyflavanone ou la 3,7-diméthoxy-5-hydroxyflavone.[155] Des flavonoïdes simples de la sorte ont également été retrouvés chez *C. costata* (7-hydroxy-5,6-diméthoxyflavone).[156] Chez *C. moschata*, une espèce brésilienne, on retrouve des flavonoïdes glycosylés comme la quercetine 3-0-glucopyranoside.[157]




Cryptochinone A (**47**)

Le tableau 4 résume quelques unes des activités biologiques observées pour les flavonoïdes isolés du genre *Cryptocarya*. On retiendra notamment l'activité antiproliférative

155. Chou, T.-H. et al. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *5* 6–11.
156. Usman, H. et al. *Z. Naturforsch., C : Biosci.*, **2006**, *61* 184–8.
157. Bandeira, K. F. ; Cavalheiro, A. J. *Chromatographia*, **2009**, *70* 1455–1460.

de la cryptocaryone envers les cellules du cancer de la prostate hormono-résistant. La cryptocaryone n'est pas sensible aux mécanismes d'efflux de drogues (MDR) exprimées par les cellules cancéreuses de cette lignée.[158]

**Tableau 4.** Activités biologiques de quelques flavonoïdes de *Cryptocarya*

| Espèce | Composé | Activité biologique | Ref. |
|---|---|---|---|
| *C. obovata* [140] | obochalcolactone | cytotoxiques modérés | [140, 151, 153, 155] |
| *C. kurzii* [153] | kurziflavolactone B | | |
| | kurzichalcolactone | | |
| *C. infectoria* [152] | cryptocaryanone A et B | | |
| | infectocaryone | | |
| *C. konishii* [151] | cryptocaryone | inh. voie NF-$\kappa$B | [144] |
| *C. rugulosa* [144] | | pro-apoptotique | [158] |
| *C. infectoria* [152] | | | |
| *C. longifolia* [1] | | | |
| *C. obovata* [140] | pinocembrine | bactériostatique | [159] |
| *C. strictifolia* [143] | | antifongique | [160] |
| *C. konishii* [151] | | antiinflammatoire | [161, 162] |
| *C. chartacea* [1] | | | |

158. Chen, Y.-C. et al. *J. Urology*, **2010**, *183* 2409–18.
1. Travaux personnels

# Chapitre 2

# Travaux personnels

**Plan**


2.1 Étude phytochimique de *Cryptocarya chartacea* . . . . . **79**
2.1.1 Récolte et identification . . . . . 79
2.1.2 Résultats préliminaires . . . . . 80
2.1.3 Extraction et purification des chartacéones . . . . . 80
2.1.4 Caractérisation des composés isolés . . . . . 84
2.2 Analyse configurationnelle des chartacéones . . . . . **92**
2.2.1 Analyse configurationnelle de la chartacéone A . . . . . 92
2.2.2 Analyse configurationnelle de la chartacéone B . . . . . 99
2.2.3 Purification des chartacéones bisubstituées . . . . . 102
2.3 Activités biologiques . . . . . **103**
2.3.1 Inhibition de la NS5 polymérase (DENV) et cytotoxicité . . 103
2.3.2 Sélectivité vis-à-vis d'autres polymérases virales . . . . . 105


## 2.1 Étude phytochimique de *Cryptocarya chartacea*

### 2.1.1 Récolte et identification

Les écorces de tronc de *Cryptocarya chartacea* Kostermans ont été récoltées en Mai 1998 à Port-Boisé, Province Sud, Nouvelle-Calédonie (Fig. 66). La plante a été identifiée par Marc Litaudon selon les critères botaniques décrits section 1.2.1. Un échantillon (LIT-0528) a été déposé à l'herbier du Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Appliquées du Centre IRD de Nouméa.

**Figure 66. Carte de la Nouvelle-Calédonie, localisation du lieu de récolte à Port-Boisé (A)**

### 2.1.2 Résultats préliminaires

L'extrait AcOEt des écorces de tronc de *Cryptocarya chartacea* a été fractionné au Pôle Substances Naturelles-plantes (PSN-p) de l'ICSN suivant une méthode standardisée utilisée en routine au laboratoire. L'extrait brut préalablement filtré sur polyamide est dilué dans le DMSO puis élué sur colonne de chromatographie liquide à haute pression (CLHP) selon un gradient standard. La collecte automatique permet l'obtention de 9 fractions qui seront par la suite évaporées puis mise en plaques 96 puits. L'évaluation biologique de ces fractions permet de confirmer l'activité détectée sur l'extrait brut et de localiser les fractions portant l'activité. Le fractionnement standard de l'extrait AcOEt des écorces de *Cryptocarya chartacea* conduit au chromatogramme suivant (Fig. 67). Ici l'activité est portée par les fractions 4 et 5 qui contiennent la quasi-totalité des produits de l'extrait brut. L'activité de l'extrait brut (99 % d'inhibition à $10\,\mu g\,mL^{-1}$) est confirmée mais le chromatogramme ne permet pas de sélection plus approfondie en fonction de l'activité biologique.

### 2.1.3 Extraction et purification des chartacéones

L'écorce de tronc séchée et broyée (495 g) de *Cryptocarya chartacea* (récolte LIT-0528) a été extraite par l'acétate d'éthyle puis par le méthanol. Six grammes d'extrait

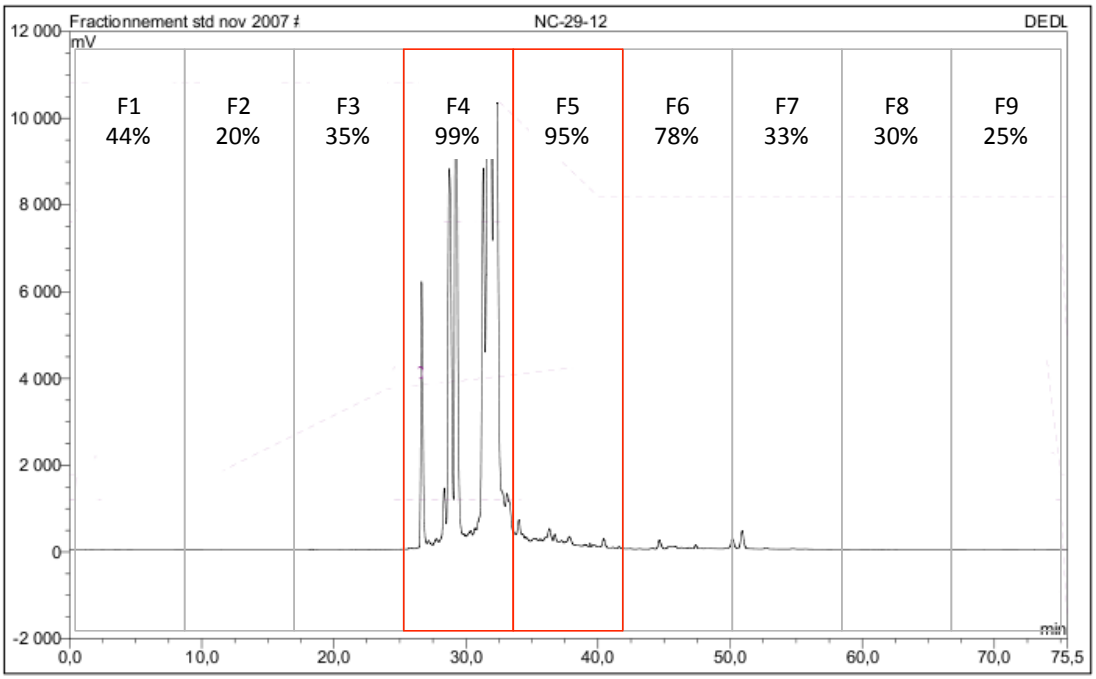



**Figure 67.** Fractionnement standard des écorces de *Cryptocarya chartacea* - activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV exprimée en pourcentage d'inhibition à $10\,\mu g\,mL^{-1}$ (Gradient $H_2O$:MeOH)

acétate d'éthyle ($\rho$ = 1,2% p/p) et 34.7 g ($\rho$ = 7%p/p) d'extrait méthanolique ont été obtenus.

La totalité de l'extrait AcOEt a été fractionnée par chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) en phase inverse suivant un gradient $H_2O$:MeOH:AcOEt de polarité décroissante. Douze fractions (F1-F12) de 220 mL chacune sont séparées puis évaporées. La fraction F6 permet d'obtenir la pinocembrine après purification par CLHP. La fraction F8 est séparée par chromatographie sur colonne (CC) de silice suivant un gradient DCM:MeOH pour obtenir 17 fractions (F1'-F17') qui sont rassemblées en fonction de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). Les fractions F10' et F11' permettent d'obtenir, après purification par CLHP, la pinocembrine à nouveau ainsi qu'une série de flavanones substituées en position 6 ou bi-substituées en positions 6,8. Ces composés, nouveaux, sont nommés « chartacéones » en référence au nom de l'espèce.

Le schéma de fractionnement avec les rendements d'extraction et les activités biologiques (ARN polymérase DENV) est présenté Fig. 68. La détermination structurale

des chartacéones A-F sera détaillée dans les pages suivantes.

Tous les produits isolés de *Cryptocarya chartacea* ont été obtenus sous forme optiquement inactive. La résolution des mélanges racémiques par purification sur colonne chirale a permis d'obtenir 4 diastéréoisomères dans les cas des chartacéones A et B. La configuration absolue des chartacéones A1-A4 a été déterminée par comparaison des spectres de dichroïsme circulaire (DC) expérimentaux avec les spectres DC calculés de façon théorique. L'étude configurationnelle des chartacéones A et B fera l'objet de la partie 2.2.

Les chartacéones présentent une inhibition significative de l'ARN polymérase du DENV. L'activité biologique des chartacéones sera détaillée dans la partie 2.3.

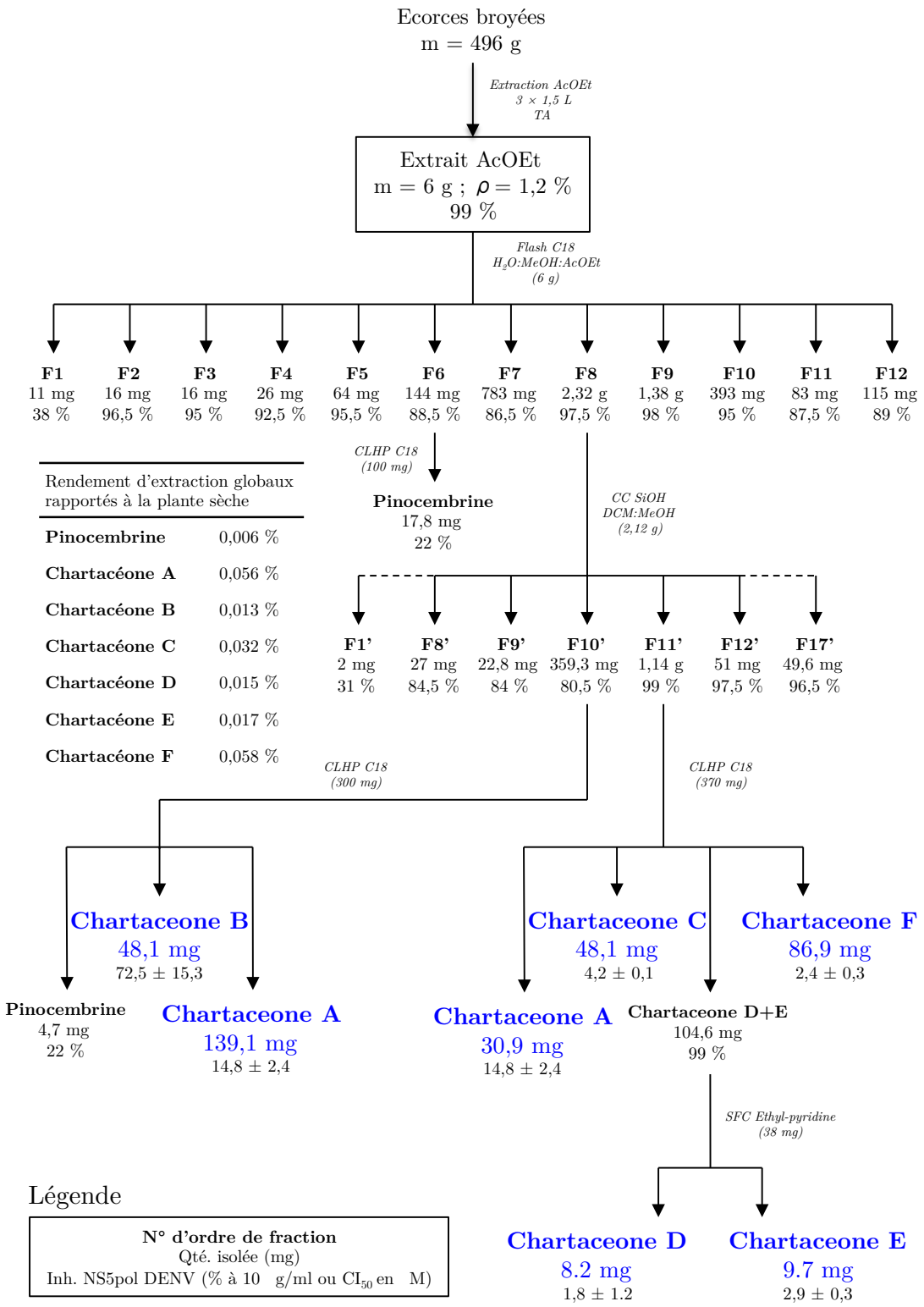
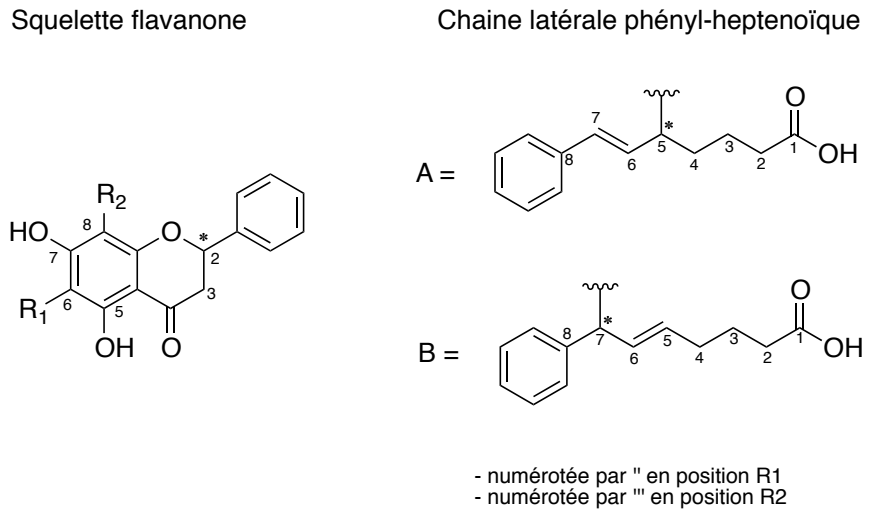



**Figure 68. Schéma d'extraction des composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea*** - activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à 10 µg mL$^{-1}$ ou en $CI_{50}$ en µM)




| | | |
|---|---|---|
| Pinocembrine | (**48**) | $R_1$=$R_2$=H |
| Chartacéone A | (**49**) | $R_1$=A, $R_2$=H |
| Chartacéone B | (**50**) | $R_1$=B, $R_2$=H |
| Chartacéone C | (**51**) | $R_1$=$R_2$=B |
| Chartacéone D | (**52**) | $R_1$=B, $R_2$=A |
| Chartacéone E | (**53**) | $R_1$=A, $R_2$=B |
| Chartacéone F | (**54**) | $R_1$=$R_2$=A |

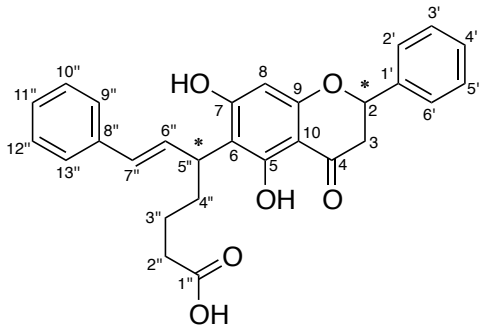
**Figure 69.** Composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea*

### 2.1.4 Caractérisation des composés isolés

La structure des composés isolés de *Cryptocarya chartacea* a été déterminée par l'analyse des données spectrométriques (UV,DC et SM) et RMN. Dans la section 2.1.4, l'élucidation de la structure plane de la chartacéone A (**49**) sera détaillée. L'analyse des autres chartacéones mettra l'accent sur les différences observées au sein de la série. Les chartacéones ayant toutes été isolées sous forme de mélanges de diastéréoisomères optiquement inactifs, les spectres et données RMN présentés dans la section 2.1.4, sont ceux de mélanges diastéréoisomériques. Seules les chartacéones A (**49**) et B (**50**) ont pu être purifiées par séparation chirale. Leur analyse configurationnelle fera l'objet d'une section séparée (2.2). L'ensemble des données RMN $^{1}$H (tableau page 305 ) et $^{13}$C (tableau page 307) des chartacéones est résumé en annexe. Pour faciliter la lecture, les structures des chartacéones sont représentées sur le volet dépliant page 309.

#### 2.1.4.1 Chartacéone A (49)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation négatif (SMHRES$^-$) montre un pic pseudo moléculaire [M-H]$^-$ à $m/z$ 457,1671 correspondant à la formule brute $C_{28}H_{25}O_6$ (masse moléculaire calculée 457,1651). Le composé présente donc 16 insaturations.




Chartacéone A (**49**)

Les maxima à 294 et 341 (épaulement) nm du spectre UV de la chartacéone A ($\lambda_{max}$ 341, 294 et 255 nm) suggèrent un squelette de type flavanone.[163] Le maximum à 255 indique la présence du groupement styrène.[164]

**Spectre du proton RMN $^1$H** La présence du système ABX ($\delta_H$ 5,43, dd, $J$ = 12,9 et 3,1 Hz; $\delta_H$ 2,75, dd, $J$ = 17,1 et 3,1 Hz et $\delta_H$ 3,08, dd, $J$ = 17,1 et 12,9 Hz) pour les protons en H-2 et H-3 (encadré en vert clair sur le spectre RMN $^1$H) confirme le squelette de type flavanone de la chartacéone A. (Fig. 71)

**Spectre du carbone RMN $^{13}$C et DEPT-135** Le spectre $^{13}$C est mis en parallèle du DEPT-135 et du spectre $^{13}$C de la pinocembrine (**48**) pour souligner les similitudes et différences au niveau du squelette carboné. (Fig. 72)

On observe la présence de 9 carbones quaternaires dont un carbonyle à 197,7 ppm et un carbone d'acide carboxylique à 178,5 ppm, 15 CH et 4 $CH_2$ ce qui est en accord avec la formule brute $C_{28}H_{26}O_6$.

163. Andersen, O.; Markham, K., *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*; CRC Press : 2006.
164. Lewis, F. D.; Zuo, X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125* 8806–13.

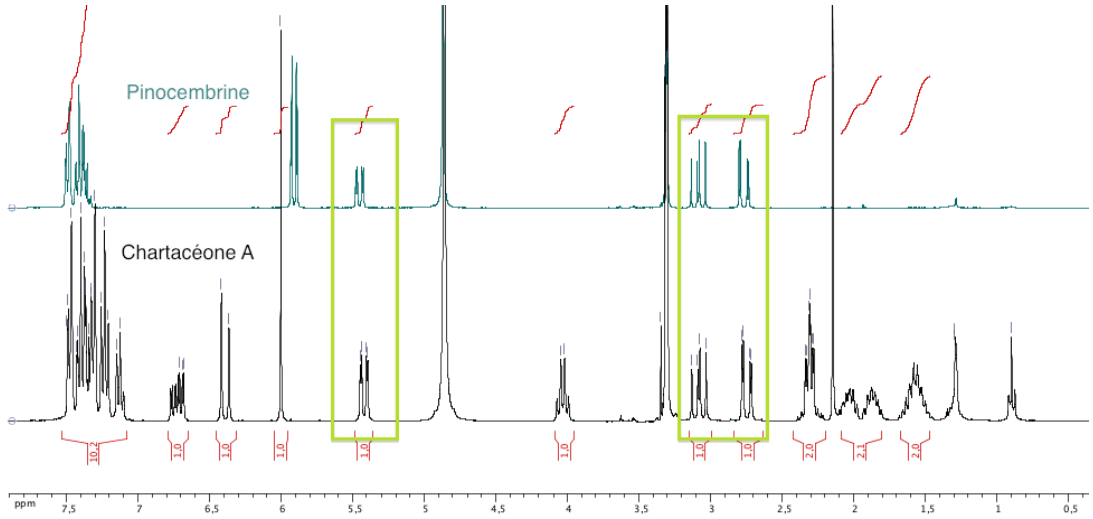



**Figure 71.** Superposition des spectres RMN $^{1}$H de la pinocembrine (**48**) (vert) et de la chartacéone A (**49**) (noir) (300 MHz, MeOD)

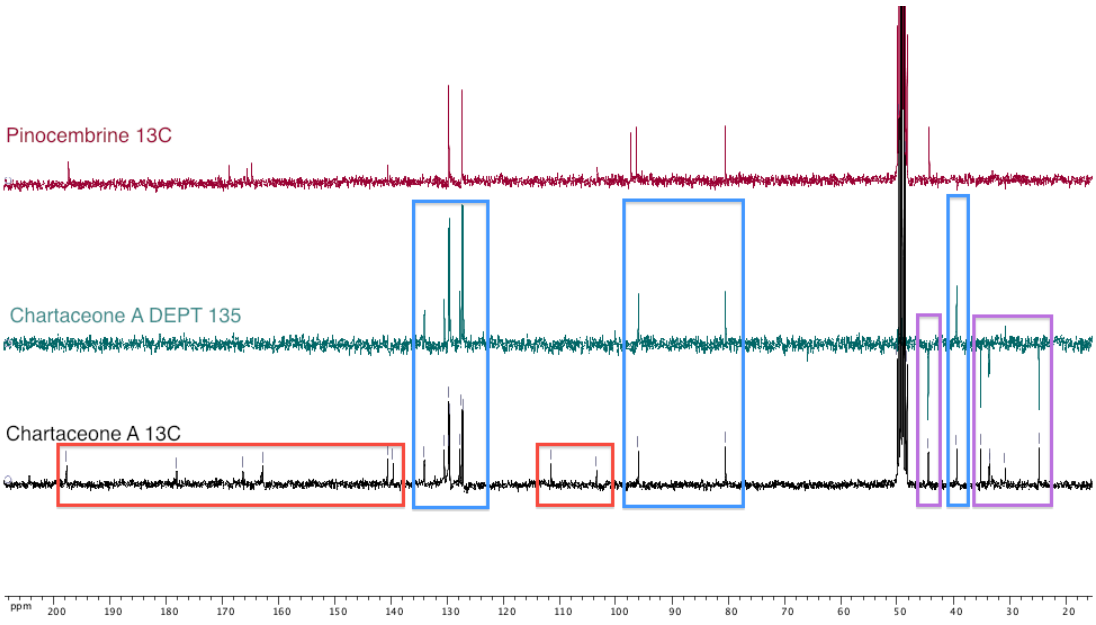



**Figure 72.** Superposition du spectre RMN $^{13}$C de la pinocembrine (**48**) (rouge) et des spectres DEPT-135 (vert) et $^{13}$C (noir) de la chartacéone A (**49**) - *encadré rouge (C quaternaires), encadré bleu (CH), encadré violet ($CH_2$)* (300 MHz, MeOD)

**Attribution des protons aux carbones : spectre HSQC** Les couplages hétéronucléaires $^1J$ proton-carbone observés par expérience HSQC permettent d'attribuer les protons aux carbones qui les portent. (Tableau 5)

**Tableau 5.** Données RMN de la pinocembrine (**48**) et de la chartacéone A (**49**) ($CD_3OD$, 300 MHz)

| | Pinocembrine (**48**) | | Chartacéone A (**49**) | |
|---|---|---|---|---|
| Position | $\delta_C$ | $\delta_H$, mult. ($J$ en Hz) | $\delta_C$ | $\delta_H$, mult. ($J$ en Hz) |
| 2 | 80.6 | 5.36, dd (12.6, 3.1) | 80.6 | 5.43, dd (12.9, 3.1) |
| 3 | 44.4 | 2.68, dd (17.1, 3.1) | 44.5 | 2.75, dd (17.1, 3.1) |
| | | 3.0, dd (17.1, 12.6) | | 3.08, dd (17.1, 12.9) |
| 4 | 197.4 | - | 197.7 | - |
| 5 | 165.7 | - | 163.1 | - |
| 6 | 97.4 | 5.8, d (2.2) | 111.6 | - |
| 7 | 168.9 | - | 166.4 | - |
| 8 | 96.5 | 5.84, d (2.2) | 96.1 | 6.00, s |
| 9 | 164.8 | - | 162.8 | - |
| 10 | 103.5 | - | 103.5 | - |
| 1′ | 140.6 | - | 140.7 | - |
| 2′ | 127.5 | 7.47 – 7.52, m | 127.5 | 7.48, d (8.0) |
| 3′ | 129.8 | 7.33 – 7.44, m | 129.8 | 7.35 – 7.43 |
| 4′ | 129.8 | 7.33 – 7.44, m | 129.7 | 7.35 – 7.43 |
| 5′ | 129.8 | 7.33 – 7.44, m | 129.8 | 7.35 – 7.43 |
| 6′ | 127.5 | 7.47 – 7.52, m | 127.5 | 7.48, d (8.0) |
| 1″ | | | 178.5 | - |
| 2″ | | | 35.5 | 2.30. m |
| 3″ | | | 25 | 1.57. m |
| 4″ | | | 33.7[b] | 1.87 et 2.03, m |
| | | | 33.8[a] | 1.87 et 2.03, m |
| 5″ | | | 39.5 | 4.05, q (8.5) |
| 6″ | | | 134.1[a] | 6.74, dd (15.9, 8.5)[a] |
| | | | 134.2[b] | 6.72, dd (15.9, 8.5)[b] |
| 7″ | | | 130.5 | 6.41. d (15.9) |
| 8″ | | | 139.7 | - |
| 9″ | | | 127.2 | 7.32, d (7.4) |
| 10″ | | | 129.6 | 7.24, t (7.4) |
| 11″ | | | 127.9 | 7.13, t (7.4) |
| 12″ | | | 129.6 | 7.24, t (7.4) |
| 13″ | | | 127.2 | 7.32, d (7.4) |

[a] Déplacements chimiques des chartacéones A1 (**55**) et A4 (**58**)
[b] Déplacements chimiques des chartacéones A2 (**56**) et A3 (**57**)

**Analyse des spectre 2D COSY et HMBC** Les corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HMBC permettent de déterminer la structure de la chaîne latérale portée par la chartacéone A (**49**) comme étant un acide *(E)*-7-phénylhept-6-énoïque lié

par son carbone C-5 au squelette pinocembrine (**48**). (Fig. 73)

La géométrie de la double laison $\Delta^6$ a été déterminée comme étant *trans* sur la base de la constante de couplage élevée observée entre H-6″ et H-7″ ($J$ = 15,9 Hz).

La réalisation d'expériences RMN dans le $CDCl_3$ permet d'observer le proton chélaté OH-5 ($\delta_H$ 12,50). La substitution de la chaîne latérale sur la position 6 de la flavanone est déterminée par les corrélations HMBC suivantes : C-5,C-6 et C-10 avec l'OH-5 chélaté et C-5, C-6 et C-7 avec le proton de méthine H-5″. Dans le $CD_3OD$, le proton de méthine H-5″ de la chaîne de type A résonne à $\delta_H$ 4,05.

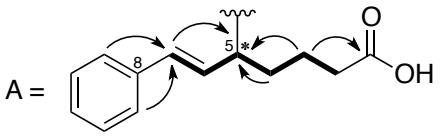
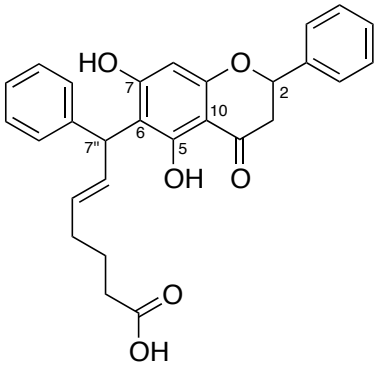



**Figure 73.** Corrélations clés de la chaîne latérale de la chartacéone A (**49**). COSY (gras) et HMBC (flèches)

### 2.1.4.2 Chartacéone B (50)




Chartacéone B (**50**)

Pour la chartacéone B (**50**), le spectre SMHRES $^-$ indique un pic pseudo moléculaire $[M\text{-}H]^-$ à $m/z$ 457.1653 correspondant à la formule brute $C_{28}H_{25}O_6$ (masse moléculaire calculée 457,1651).

Comme pour la chartacéone A (**49**), le maximum à 294 nm suivi d'un épaulement à 341 nm suggèrent un squelette de type flavanone pour la chartacéone B (**50**).[163] Cependant, le spectre UV de la chartacéone B (**50**) ($\lambda_{max}$ 341 et 294 nm) ne présente

pas d'autre maximum, suggérant l'absence du chromophore de type styrène présent chez la chartacéone A (**49**).

Là encore, la présence du système ABX ($\delta_H$ 5,44, dd, $J$ = 12,9 et 3,1 Hz; $\delta_H$ 2,75, dd, $J$ = 17,1 et 3,1 Hz et $\delta_H$ 3,09, dd, $J$ = 17,1 et 12,9 Hz) confirme le squelette de type flavanone de la chartacéone B.

La comparaison de spectres RMN $^1$H de la chartacéone A (**49**) (vert) et de la chartacéone B (**50**) indique que les différences entre les deux structures se situent au niveau de la chaîne latérale. (Fig. 75) Effectivement, les corrélations COSY et HMBC (Fig. 76) permettent de déterminer la nature de la chaîne latérale comme étant ici l'acide *(E)*-7-phénylhept-5-énoïque lié par son carbone C-7″.

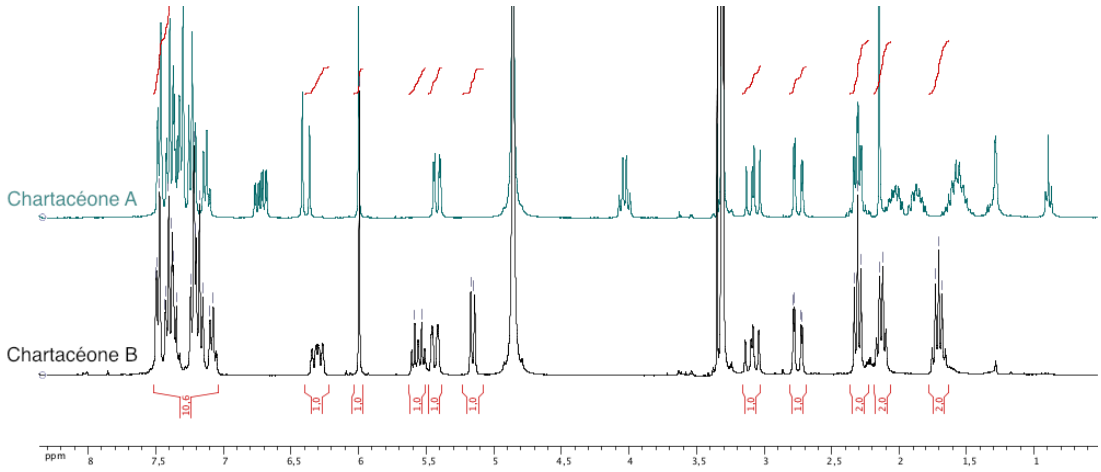



**Figure 75. Superposition des spectres RMN $^1$H de la chartacéone A (49) (vert) et de la chartacéone B (50) (noir)**

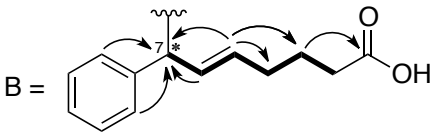


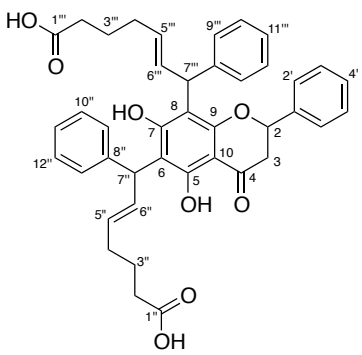

**Figure 76.** Corrélations clés de la chaîne latérale de la chartacéone B (**50**). COSY (gras) et HMBC (flèches)

Tout comme pour la chartacéone A (**49**), la substitution de la chaîne latérale sur la position 6 de la flavanone est déterminée par les corrélations HMBC suivantes : C-5,C-6 et C-10 avec l'OH-5 chélaté ($\delta_H$ 12,48) et C-5, C-6 et C-7 avec le proton de méthine

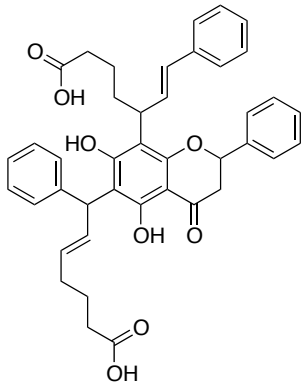
H-7″. Dans le $CD_3OD$, le proton de méthine H-7″ de la chaîne de type B, plus déblindé que la méthine H-5″ dans la chaîne de type A, résonne à $\delta_H$ 5,16.

#### 2.1.4.3 Chartacéones C, D, E et F (51, 52, 53 et 54)

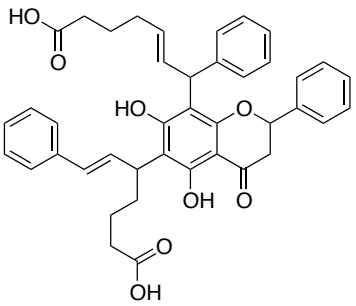
Les spectres (SMHRES$^-$) des chartacéones C, D, E et F (**51**, **52**, **53** et **54**) montrent un pic pseudo moléculaire [M-H]$^-$ à $m/z$ 659,2653, 659,2689, 659,2653 et 659,2603, respectivement, correspondant à la formule brute $C_{41}H_{39}O_8$ (masse moléculaire calculée 659,2645). Les composés présentent donc 22 insaturations. La différence de masse observée par rapport aux chartacéones A (**51**) et B (**50**) correspond à $C_{13}H_{14}O_2$ et indique une substitution par une deuxième chaîne latérale phénylheptenoïque.



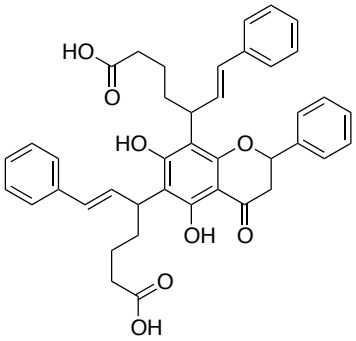

Chartacéone C (**51**)




Chartacéone D (**52**)




Chartacéone E (**53**)




Chartacéone F (**54**)

**Chartacéone C (51)** Le spectre UV de la chartacéone C (**51**) ($\lambda_{max}$ 342 et 296 nm) indique l'absence de chromophore de type styrène et donc la substitution par des

chaînes de type B (*(E)*-7-phénylhept-5-énoïque). La présence de deux chaînes de type B est confirmée par la présence de deux protons de méthines à $\delta_H$ 5,18 et 5,26 pour H-7″ et H-7‴, respectivement.

**Chartacéone F (54)** Une bande d'absorption intense à 250 nm dans le spectre UV de la chartacéone F (**54**) ($\lambda_{max}$ 341, 294 et 250 nm) ainsi que la présence de deux protons de méthines à $\delta_H$ 4,06 et 4,01 pour H-5″ et H-5‴, respectivement, indique une substitution par deux chaînes de type A (*(E)*-7-phénylhept-6-énoïque).

**Chartacéones D et E (52 et 53)** Les spectres RMN $^1$H des chartacéones D et E (**52** et **53**) présentent des protons à $\delta_H$ 3,98 et 5,28 pour H-5‴ et H-7″, respectivement, (chartacéone D (**52**)); et à $\delta_H$ 4,05 et 5,20 pour H-5″ et H-7‴, respectivement, (chartacéone E (**53**)). Ces signaux indiquent la substitution par une chaîne de type A et une chaîne de type B.

• Pour la chartacéone D (**52**), le spectre HMBC réalisé dans le DMF-$d_7$ permet d'observer des tâches de corrélations croisées entre le proton de méthine H-7″ et l'OH « chélaté » $\delta_H$ 13,14, et les carbones quaternaires C-5 ($\delta_C$ 161,0) et C-6 ($\delta_C$ 113,3) permettant ainsi de positionner la chaîne de type B en position C-6 et la chaîne de type A en C-8.

• De même, pour la chartacéone E (**53**), les tâches de corrélations croisées entre le proton de méthine H-5″ et l'OH « chélaté » $\delta_H$ 13,12, et les carbones quaternaires C-5 ($\delta_C$ 161,7) et C-6 ($\delta_C$ 112,7) observées sur le spectre HMBC permettent de positionner la chaîne de type A en position C-6 et la chaîne de type B en C-8.

De façon intéressante, si l'on observe un agrandissement dans la zone des aromatiques des spectres RMN $^1$H des chartacéones C-F (**51-54**), on peut noter un net effet de blindage sur les protons aromatiques des chartacéones C (**51**) et E (**53**). Cet effet de blindage est possiblement dû au phénomène de $\pi$-stacking observé lors de la superposition d'orbitales $\pi$ de cycles aromatiques.[165] La superposition aurait donc lieu entre le cycle aromatique de la flavanone et le cycle aromatique de la chaîne de type B lorsqu'elle est en position 8. (Fig. 81)

165. Martin, N. H. et al. *J. Mol. Graph. Model.*, **2008**, *26* 1125–30.

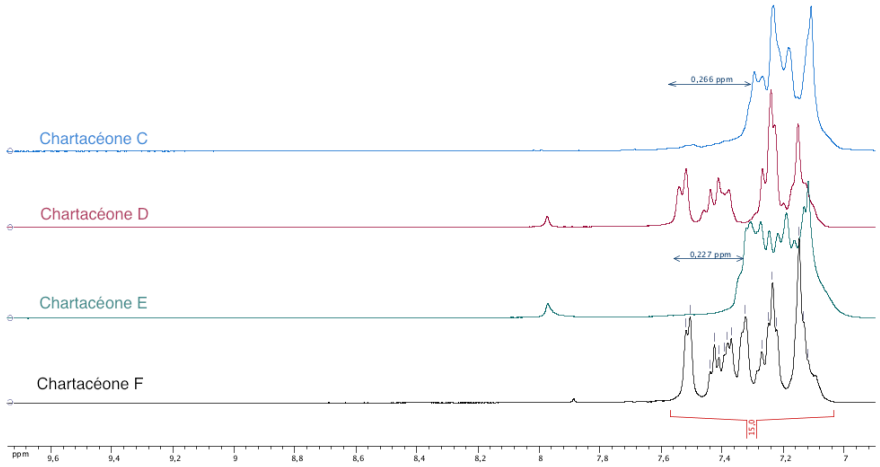



**Figure 81. Superposition des spectres RMN $^{1}$H des chartacéones C-F (51-54)** - région des aromatiques.

## 2.2 Analyse configurationnelle des chartacéones

La chartacéone A (**49**) possède deux centres de chiralité. En C-2, au niveau du carbone portant le phényle de la flavanone, et en C-5″, au niveau du carbone de la chaîne latérale relié au noyau flavanone. Des signaux dédoublés pour le proton H-6″ ($\delta_H$ 6,73, ddd (15,9, 8,5, 5,4)) et les carbones C-4″ ($\delta_C$ 33,7 et 33,8) et C-6″ ($\delta_C$ 134,1 et 134,2) adjacents au centre chiral C-5″, ainsi que l'absence d'activité optique indique que la chartacéone A (**49**) est un mélange racémique de diastéréoisomères.

### 2.2.1 Analyse configurationnelle de la chartacéone A (49)

#### 2.2.1.1 Séparation des diastéréoisomères de la chartacéone A (49)

Le mélange diastéréoisomèrique n'est pas résolu sur colonne de CLHP C18. La chartacéone A est donc injectée directement en CLHP chirale analytique (colonne Chiralpak AD) et éluée par un isocratique *n*-heptanes:EtOH+0,1%AF (70:30). On obtient le chromatogramme 82.

L'intégration des aires sous la courbe de chaque pic correspond environ à 25%. Effectivement, après passage de 85 mg de chartacéone A (**49**) en CLHP chirale semi-préparative on obtient les quatre diastéréoisomères dans un ratio 1:1:1:1 (environ 20 mg de chaque). Les produits obtenus sont nommés chartacéones A1, A2, A3 et A4 (**55**, **56**, **57** et **58**) en fonction de leur ordre d'élution.

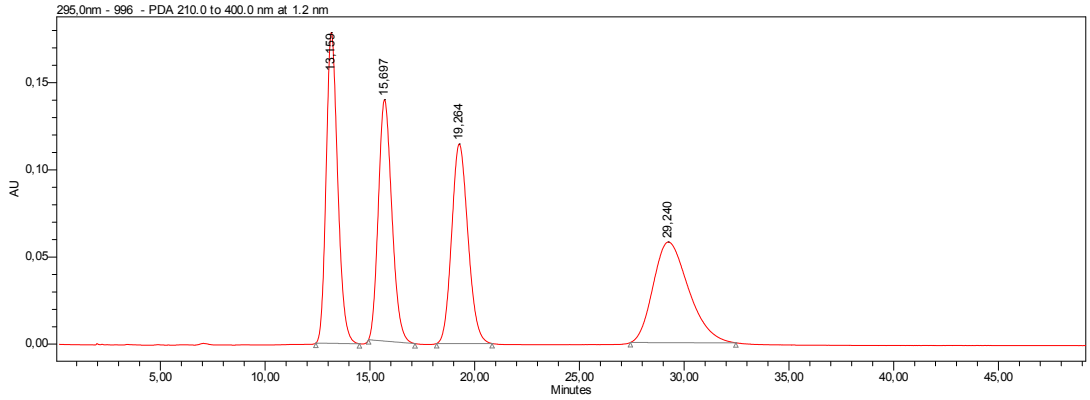



**Figure 82. Chromatogramme de la purification chirale de la chartacéone A (49)**

### 2.2.1.2 Dichroïsme circulaire des chartacéones A1-A4 (55-58)

Les courbes de DC de chacune des chartacéones A1-A4 (**55-58**) sont mesurées. (Fig. 83) L'observation de ces courbes permet de mettre en évidence la nature énantiomérique des chartacéones A1 (**55**) et A4 (**58**) et des chartacéones A2 (**56**) et A3 (**57**). La mesure du pouvoir rotatoire confirme la nature énantiomérique des couples chartacéones A1 (**55**) et A4 (**58**) ($[\alpha]_D^{25}$ +81,5, -88, respectivement) et chartacéones A2 (**56**) et A3 (**57**) ($[\alpha]_D^{25}$ -56,0, +56,0, respectivement).

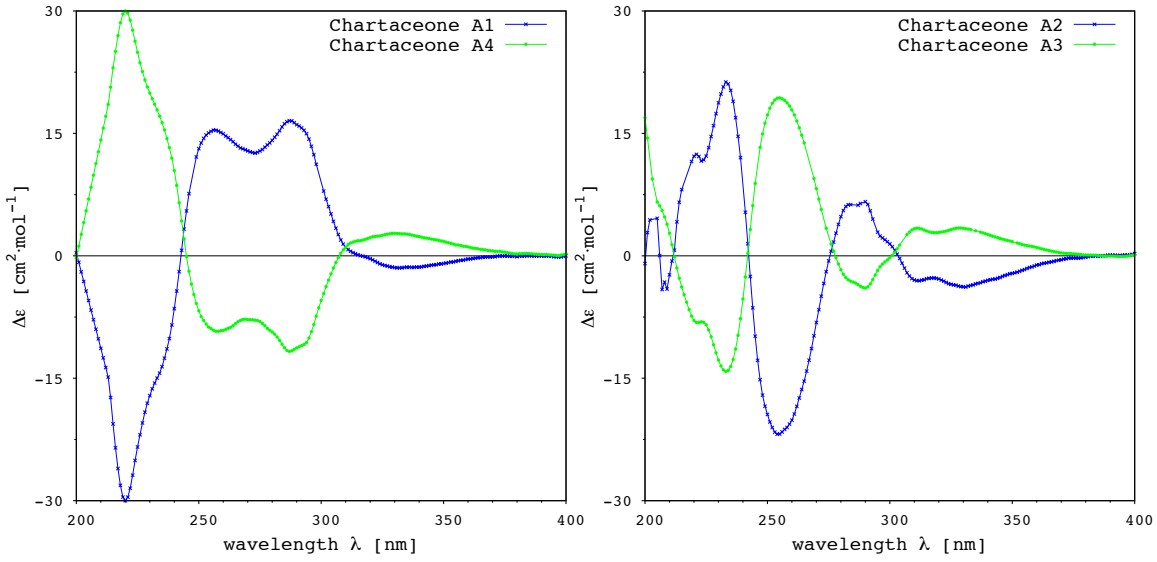



**Figure 83.** Courbes de dichroïsme circulaire des chartacéones A1-A4 (**55-58**)

Ces 4 courbes de DC différentes sont la signature d'une configuration absolue donnée.

Nous verrons, dans les deux prochaines sections, l'étude menée afin de relier ces courbes expérimentales aux configurations absolues des chartacéones A1-A4 (**55-58**).

**Détermination de la configuration en C-2** En 1970, Gaffield étudie de façon approfondie les corrélations entre la configuration absolue des flavanones et des 3-hydroxyflavanones et leurs courbes de dichroïsme circulaire. Il ressort de cette étude qu'une flavanone de configuration 2*(S)* présentera un effet Cotton (EC) positif à $\sim$ 330 nm (dû aux transitions $n \rightarrow \pi^*$) et un EC négatif entre 280 et 290 nm (dû aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$).[166] Cette règle empirique est depuis devenue un outil général simple, sensible et fiable pour la détermination de la configuration absolue des flavanones en C-2.[167] En appliquant cette règle empirique aux courbes de DC des chartacéones, on peut déjà fixer la configuration en C-2 comme indiqué dans le tableau 6.

| Composé | EC (nm) | | Configuration en C-2 |
|---|---|---|---|
| | $\pi \rightarrow \pi^*$ | $n \rightarrow \pi^*$ | |
| Chartacéone A1 (**55**) | 287 + | 331 − | *(R)* |
| Chartacéone A2 (**56**) | 289 + | 331 − | *(R)* |
| Chartacéone A3 (**57**) | 290 − | 328 + | *(S)* |
| Chartacéone A4 (**58**) | 287 − | 330 + | *(S)* |

**Tableau 6.** Configuration du centre chiral en C-2 des chartacéones A1-A4 (**55-58**)

On observe quatre effets Cotton principaux sur les courbes de DC des chartacéones A1-A4 (**55-58**) (voir Fig. 83). Si l'on compare ces courbes avec les EC observés pour la 2*(S)*-pinocembrine (DC nm ($\Delta\varepsilon$) 287 ( −), 328 (+)[168] on peut supposer que les deux EC observés aux longueurs d'onde inférieures (à $\sim$ 255 et 230-220 nm) ont pour principale origine la chiralité en C-5″ de la chaîne latérale phénylheptenoïque.

**Détermination de la configuration en C-5″**

**Intérêt des méthodes de calculs théoriques** L'interprétation des spectres de DC peut-être faite par comparaison avec les données chiroptiques de composés connus ou du moins proches structuralement (ce que nous avons fait pour la détermination de la configuration en C-2 des chartacéones A1-A4 (**55-58**)). Une autre façon d'interpréter

166. Gaffield, W *Tetrahedron*, **1970**, *26* 4093–4108.
167. Slade, D. et al. *Phytochemistry*, **2005**, *66* 2177–215.
168. Su, B.-N. et al. *Phytochemistry*, **2003**, *63* 335–341.

les spectres de DC consiste en l'application de « règles » de DC comme la règle de l'octant[169,170] ou la méthode de l'exciton chirality[171], ces règles nécessitent cependant de remplir des conditions particulières au niveau structural.[172] L'interprétation des courbes de DC est, sans aucun doute, l'aspect le plus compliqué dans cette méthode chiroptique, particulièrement dans le cas de composés nouveaux.

Cependant, avec le développement de la chimie quantique et des méthodes de calculs associées, il est désormais possible de prédire de façon théorique les spectres de DC de molécules de configuration donnée. La comparaison des spectres expérimentaux et calculés donnant alors accès à la configuration absolue de la molécule. Le grand intérêt de ces méthodes est de ne pas avoir de pré-requis structuraux, si ce n'est la taille de la molécule (pour des raisons de temps de calcul).

Les méthodes de calcul théorique de spectres de DC ont permis la détermination de configurations absolues de nombreux composés chiraux.[173–175] Plusieurs méthodes de chimie quantique sont disponibles pour ces calculs mais la plus utilisée actuellement est sans doute la méthode TDDFT[176] (pour Time-Dependent Density Functionnal Theory ou théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps). La méthode TDDFT au niveau B3LYP/6-31G [a] *et*[177,178] s'est montrée particulièrement adaptée aux calculs des spectres de DC de flavonoïdes.[179–181]

Avec les progrès exponentiels au niveau de l'informatique, la démocratisation de ces méthodes de calcul quantique permettra sans doute de donner une nouvelle jeunesse à cette ancienne méthode chiroptique qu'est le dichroïsme circulaire.

169. Mislow, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83* 2771–2772.
170. Weigang, O. E. ; Höhn, E. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88* 3673–3674.
171. Harada, N. ; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.*, **1972**, *5* 257–263.
172. Berova, N. et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36* 914–31.
173. Claps, M. et al. *Tetrahedron : Asymmetry*, **2006**, *17* 1387–1393.
174. Giorgio, E. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13* 5072–9.
175. Caccamese, S. et al. *Tetrahedron : Asymmetry*, **2011**, *22* 270–276.
176. Gross, E. et al. *Density Functional Theory II*, **1996**, *181* 81–172.
a. B3LYP/6-31G est une fonctionnelle. Sommairement, elle indique le niveau de précision de la TDDFT, c'est un compromis entre exactitude et temps de calcul.
177. Lee, C et al. *Phys. Rev. B : Condens. Matter*, **1988**, *37* 785–789.
178. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98* 5648.
179. Ding, Y. et al. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72* 9010–7.
180. Ding, Y. et al. *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72* 327–35.
181. Ding, Y. et al. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73* 435–40.

**Application au calcul de DC des chartacéones A** Pour déterminer la contribution de la chiralité en C-5″ aux spectres expérimentaux de DC des chartacéones A1-A4 (**55-58**), nous avons entrepris une étude théorique en nous servant de la méthode TDDFT pour le calcul de spectres de DC.

Comme nous nous intéressons à la chiralité en C-5″, nous avons arbitrairement fixé la configuration en 2*(R)* et avons travaillé sur les chartacéones A de configuration 2*(R)*,5″*(R)* et 2*(R)*,5″*(S)*. Pour chaque configuration, 2000 conformères ont été générés de manière aléatoire par la méthode de Monte-Carlo[182] puis minimisés énergétiquement dans le $CHCl_3$ par mécanique moléculaire (méthode PRCG[183]).

De par l'important degré de liberté de la chaîne latérale de la chartacéone A, la recherche conformationnelle a conduit à un grand nombre de structures. L'observation de ces conformères permet de les classer en deux grands groupes : un groupe dans lequel les structures présentent une chaîne latérale repliée permettant ainsi une liaison hydrogène entre l'oxygène de l'acide carboxylique de la chaîne latérale et l'hydrogène de l'OH-7, et un second groupe dans lequel les conformères présentent une chaîne latérale étendue. (Fig. 84)

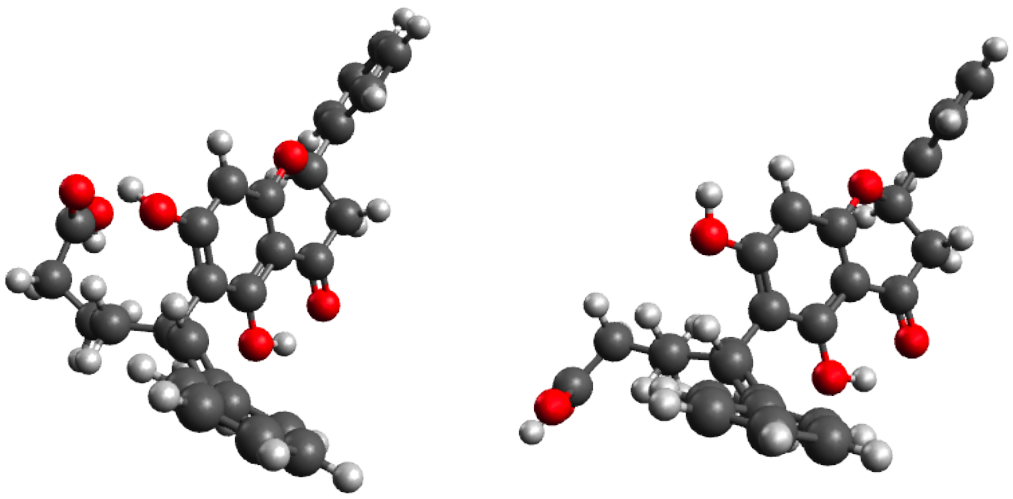


**Figure 84.** Structures tridimensionnelles de conformères de chartacéone A de configuration 2*(R)*,5″*(R)*, à gauche chaîne latérale repliée formant une liaison hydrogène avec l'OH-7, à droite chaîne latérale étendue.

182. Chang, G. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111* 4379–4386.
183. Polak, E. ; Ribiere, G. *Rev. Fr. Inform. Rech. O.*, **1969**, *3* 35–43.

Dans un premier temps, seuls les 2 conformères les plus stables de chaque groupe (chaîne repliée et chaîne étendue) ont été engagés dans les calculs *ab initio.*[a] Les structures des 4 conformères sélectionnés ont été optimisées par TDDFT au niveau B3LYP/6-31G(d,p) sur le logiciel *Gaussian03.*[184] Ces premiers calculs indiquent que les conformères dont l'acide carboxylique de la chaîne latérale est engagé dans une liaison hydrogène sont plus stables ($\sim 3\,\mathrm{kcal\,mol^{-1}}$) que les conformères dont la chaîne latérale est étendue. Par conséquent, seuls les conformères présentant une chaîne repliée dans la tranche des $3\,\mathrm{kcal\,mol^{-1}}$ ainsi que les 2 plus stables des conformères à la chaîne étendue ont été optimisés au niveau B3LYP. Cette sélection a été appliquée aux deux configurations *2(R),5″(R)* et *2(R),5″(S)* conduisant, dans chaque cas, à la sélection de 6 conformères.

Les calculs de DC sont effectués pour chaque conformère puis les courbes individuelles sont additionnées en suivant la répartition de Boltzmann[b] *et*[185] pour obtenir la courbe de DC calculée finale.

Les calculs d'orbitales moléculaires des conformères étudiés confirment que les EC observés à $\sim$ 255 et 230-220 nm sont causés principalement par la perturbation électronique du chromophore de type styrène en C-5″.

Les courbes de DC simulées pour les composés de configuration *2(R),5″(R)* et *2(R),5″(S)* sont superposées aux courbes de DC expérimentales des chartacéones A1 (**55**) et A2 (**56**), respectivement. (Fig. 85)

Dans la région 350-280 nm, majoritairement sous l'influence de la chiralité en C-2, l'adéquation entre les courbes de DC expérimentales et calculées est approximative. En revanche, dans les longueurs d'onde plus basses du spectre, influencées par la chiralité en C-5″, on observe clairement un EC positif ($\sim$ 255 nm) suivi d'un EC négatif ($\sim$ 220 nm) pour la courbe de DC calculée pour la configuration *2(R),5″(R)* et pour la courbe de DC expérimentale de la chartacéone A1 (**55**). De la même façon, on observe un EC négatif ($\sim$ 255 nm) suivi d'un EC positif (220-230 nm) pour la courbe de DC calculée pour la configuration *2(R),5″(S)* et pour la courbe de DC expérimentale de la chartacéone A2 (**56**).

a. La méthode TDDFT est une méthode de calcul théorique qualifiée de méthode *ab initio*

184. Frisch, M. J. et al. *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

b. Cette pondération permet d'ajuster la contribution de chaque conformère à la courbe de DC totale proportionnellement à son énergie.

185. Bringmann, G. et al. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009** 2717–2727.

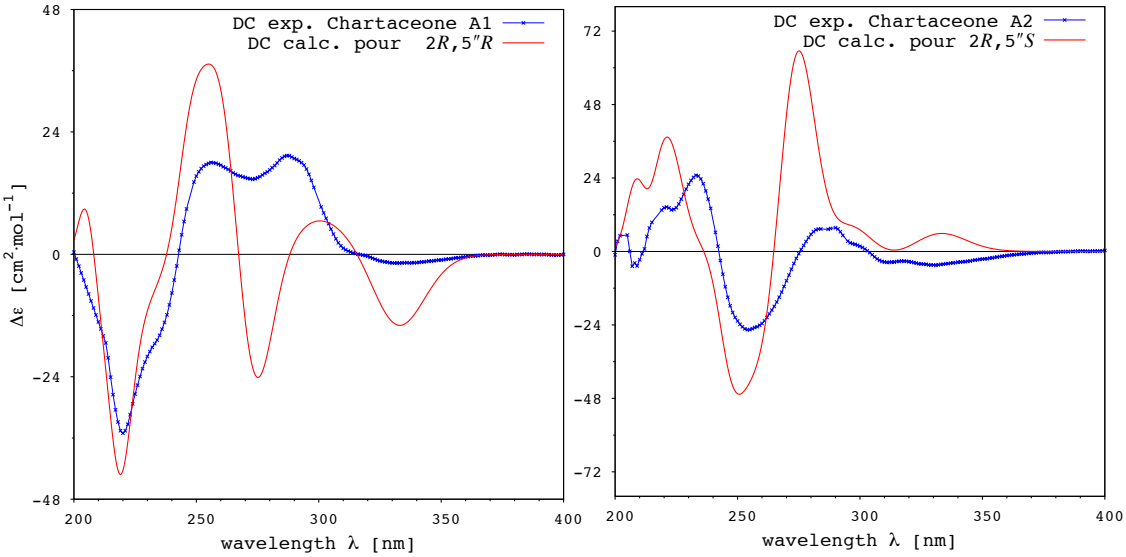
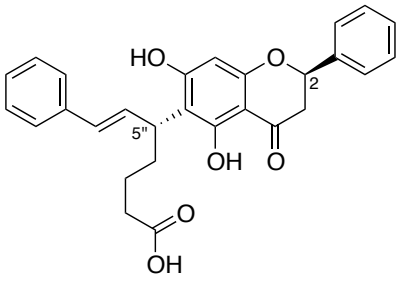
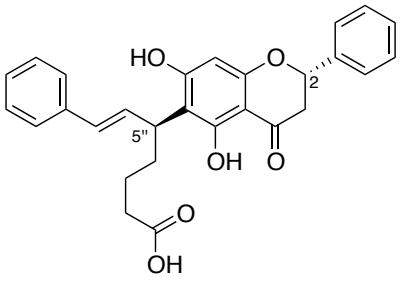


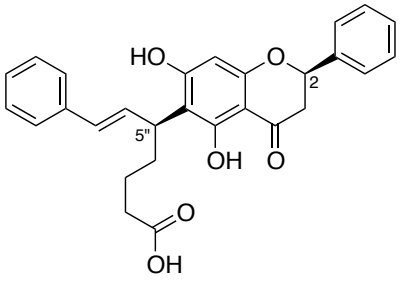

**Figure 85.** Superposition des courbes de DC calculées et expérimentales pour 2*(R)*,5″*(R)*/chartacéone A1 (**55**) et 2*(R)*,5″*(S)*/chartacéone A2 (**56**)



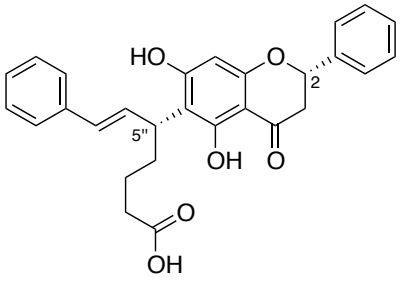
Chartacéone A1 (**55**)



Chartacéone A4 (**58**)



Chartacéone A2 (**56**)



Chartacéone A3 (**57**)

**Figure 86.** Configuration absolue des chartacéones A1-A4 (**55-58**)

En prenant en compte les observations faites quant à la chiralité en C-2 (section 2.2.2.2), cette étude de dichroïsme circulaire nous permet d'attribuer la configuration absolue 2*(R)*,5″*(R)* à la chartacéone A1 (**55**) et 2*(R)*,5″*(S)* à la chartacéone A2 (**56**). La nature énantiomérique de (**55**) et (**58**), et (**56**) et (**57**) nous permet d'attribuer les configurations absolues 2*(S)*,5″*(S)* et 2*(S)*,5″*(R)* aux chartacéones A3 (**57**) et A4 (**58**), respectivement.

### 2.2.2 Analyse configurationnelle de la chartacéone B (50)

Comme la chartacéone A (**49**), la chartacéone B (**50**) possède deux centre chiraux (C-2 et C-7″). Le dédoublement des signaux pour le proton H-6″ ainsi que l'absence d'activité optique indique que la chartacéone B (**50**) est un mélange racémique de diastéréoisomères.

#### 2.2.2.1 Séparation des diastéréoisomères de la chartacéone B (50)

La chartacéone B est injectée en CLHP chirale analytique (colonne Chiralpak AD) et éluée par un isocratique Heptane+0,1%AF:EtOH+0,1%AF (87:13). On obtient le chromatogramme 87.

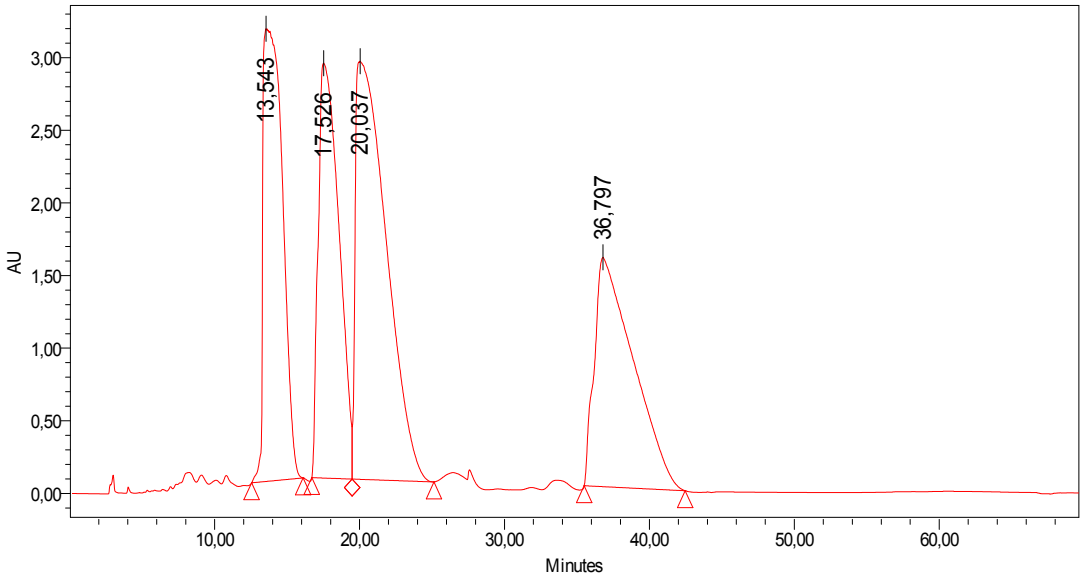



**Figure 87. Chromatogramme de la purification chirale de la chartacéone B (50)**

L'injection de 44,9 mg de chartacéone B (**50**) en CLHP chirale semi-préparative

permet d'obtenir les 4 chartacéones B1 (10 mg), B2 (7,9 mg), B3 (11 mg) et B4 (7,8 mg)(**59**, **60**, **61** et **62**).

#### 2.2.2.2 Dichroïsme circulaire des chartacéones B1-B4 (59-62)

Les courbes de DC de chacune des chartacéones B1-B4 (**59-62**) sont mesurées. (Fig. 88) L'observation de ces courbes permet de mettre en évidence la nature énantiomérique des chartacéones B1 (**59**) et B4 (**62**) et des chartacéones B2 (**60**) et B3 (**61**). La mesure du pouvoir rotatoire confirme la nature énantiomérique des couples chartacéones B1 (**59**) et B4 (**62**) ($[\alpha]_D^{25}$ -31, +35, respectivement) et chartacéones B2 (**60**) et B3 (**61**) ($[\alpha]_D^{25}$ +45, -48, respectivement).

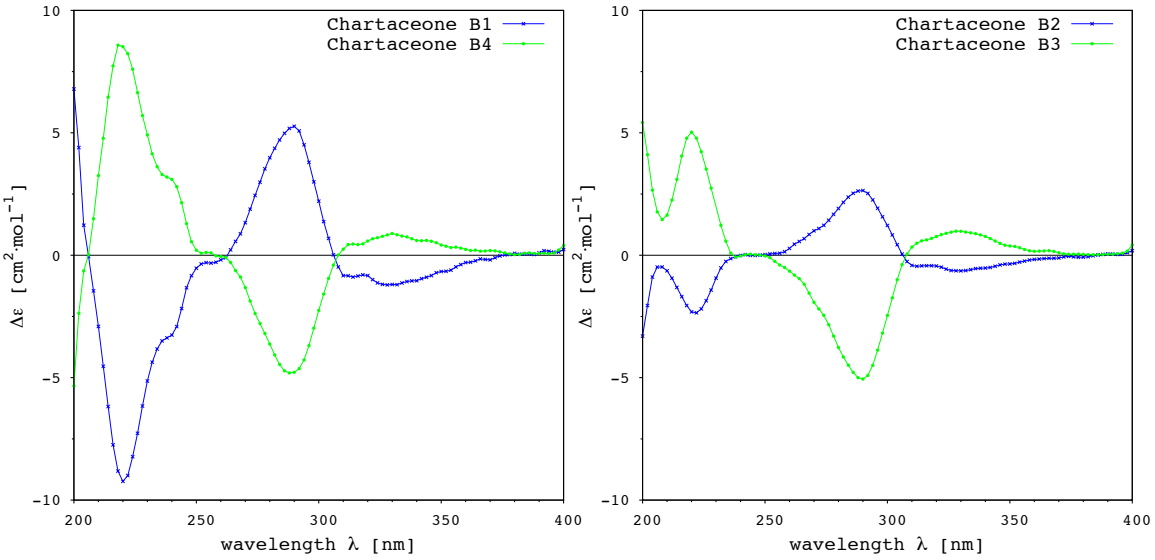



**Figure 88.** Courbes de dichroïsme circulaire des chartacéones B1-B4 (**59-62**)

**Détermination de la configuration en C-2** La règle empirique de Gaffield[166] nous permet de fixer la configuration en C-2 comme indiqué dans le tableau 7.

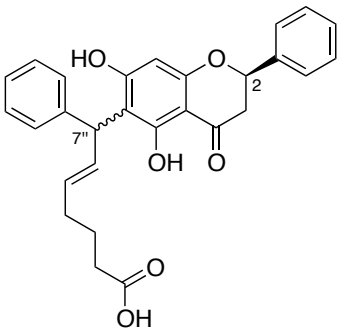
Ici, contrairement aux chartacéones A1-A4 (**55-58**), on observe seulement 3 effets Cotton principaux. L'absence du chromophore de type styrène entraîne bien la disparition de l'EC observé à $\sim$ 255 nm dans le cas des chartacéones A1-A4 (**55-58**). La disparition de ce chromophore est problématique pour la détermination de la configuration en C-7″ puisque sans cet EC les courbes de DC des chartacéones B1 (**59**) et B2 (**60**), et B3 (**61**) et B4 (**62**) sont quasi-identiques. Les seules différences situées après

| Composé | EC (nm) | | Configuration en C-2 |
|---|---|---|---|
| | $\pi \rightarrow \pi^*$ | $n \rightarrow \pi^*$ | |
| Chartacéone B1 (**59**) | 290 + | 331 − | *(R)* |
| Chartacéone B2 (**60**) | 289 + | 331 − | *(R)* |
| Chartacéone B3 (**61**) | 290 − | 328 + | *(S)* |
| Chartacéone B4 (**62**) | 288 − | 329 + | *(S)* |

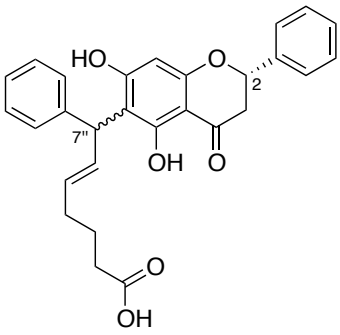
**Tableau 7.** Configuration du centre chiral en C-2 des chartacéones B1-B4 (**59-62**)

210 nm ne sont pas assez significatives pour permettre une attribution non ambigüe des courbes calculées.

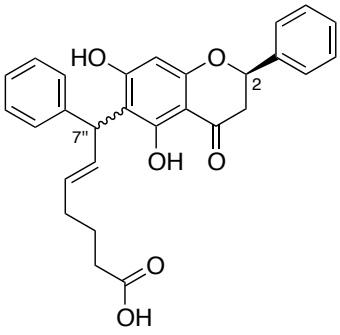
Nous n'avons donc pas pu déterminer la configuration du centre stéréogénique en C-7″ des chartacéones B1-B4 (**59-62**).



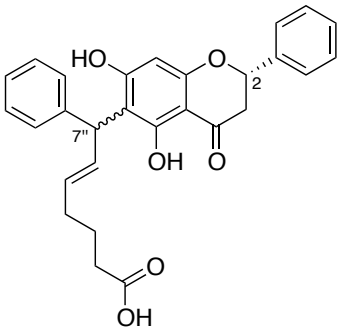

Chartacéone B1 (**59**)




Chartacéone B4 (**62**)




Chartacéone B2 (**60**)




Chartacéone B3 (**61**)

**Figure 89.** Configuration en C-2 des chartacéones B1-B4 (**59-62**)

### 2.2.3 Purification des chartacéones bisubstituées

Malgré de nombreuses tentatives, la purification des chartacéones C-F (**51-54**) sur phases non-chirales et chirales s'est révélée infructueuse.

Les phase stationnaires $C_{18}$ de type Kromasil, Sunfire, Symetry-Shield, Atlantis et X-Terra et phase monolithique Hypercarb ont été combinées avec des phases mobiles $H_2O$:MeOH, $H_2O$:ACN avec ou sans acide (acide formique et acide trifluoroacétique) pour les phases stationnaires $C_{18}$ et MeOH, AcOEt ou DCM pour la phase monolithique, sans résultats.

Les phases chirales AD, OD, IA et IC (Chiralpak) ont été employées en CLHP avec les systèmes éluants Hept:EtOH, Hept:IPA, Hexane:IPA, avec et sans acide formique. Les mêmes phases chirales avec comme systèmes éluants MeOH ou IPA ou EtOH:$CO_2$, avec et sans acide formique ont été employées en chromatographie en phase supercritique (SFC), sans séparation convenable.

## 2.3 Activités biologiques

### 2.3.1 Inhibition de la NS5 polymérase (DENV) et cytotoxicité

L'activité biologique de l'ensemble des produits purs isolés de *Cryptocarya chartacea* a été évaluée vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV-2. En parallèle, la cytotoxicité de ces produits est évaluée sur des lignées cellulaires cancéreuses (KB) et saines (MRC5). L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau 8.

| Composé | | DENV polymérase ($CI_{50}$ en µM) | KB ( % inh. à $10\,\mu g\,mL^{-1}$ ) | MRC5 ( % inh. à $10\,\mu g\,mL^{-1}$ ) |
|---|---|---|---|---|
| Pinocembrine | (**48**) | - | 0 | - |
| Chartacéone A | (**49**) | 14,8 ± 2,4 | 3,2 | 1,8 |
| ◇ Chartacéone A1 | (**55**) | 15,3 ± 1,4 | 0 | 3,9 |
| ◇ Chartacéone A2 | (**56**) | 9,0 ± 3,5 | 11 | 15,5 |
| ◇ Chartacéone A3 | (**57**) | 27 ± 6,5 | 0 | 0 |
| ◇ Chartacéone A4 | (**58**) | 7,4 ± 2,2 | 6 | 5,8 |
| Chartacéone B | (**50**) | 72,5 ± 15,3 | 0 | 11 |
| Chartacéone C | (**51**) | 4,2 ± 0,1 | 0 | 0 |
| Chartacéone D | (**52**) | 1,8 ± 1,2 | 0 | 0 |
| Chartacéone E | (**53**) | 2,9 ± 0,3 | 0 | 0 |
| Chartacéone F | (**54**) | 2,4 ± 0,3 | 0 | 0 |

**Tableau 8.** Activité inhibitrice des composés isolés de *Cryptocarya chartacea* vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV et cytotoxicité

A la lecture de ce tableau, on peut émettre plusieurs observations quant à l'activité biologique des chartacéones.

• La première est l'absence de toxicité de ces produits sur lignées cellulaires saines et cancéreuses à $10\,\mu g\,mL^{-1}$.

• Si l'on considère l'activité inhibitrice de la polymérase du DENV on observe des $CI_{50}$ allant de 1,8 ± 1,2 µM (**52**) à 72,5 ± 15,3 µM (**50**), la pinocembrine (**48**) étant inactive. Il semble donc que l'activité soit liée à la substitution par les chaînes phénylheptenoïques. (Voir Figure 90) Pour ce qui concerne les mélanges racémiques, la présence d'une chaîne de type A en 6 (composé **49**) conduit à une activité modérée, la présence d'une chaîne de type B en 6 (composé **50**) conduit à une activité plus faible alors que la présence de deux chaînes en 6 et 8 conduit aux activités les plus fortes, indépendamment de la nature des chaînes latérales.

La présence d'acides carboxyliques capable de former des liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés de la protéine cible est une explication possible à la meilleure

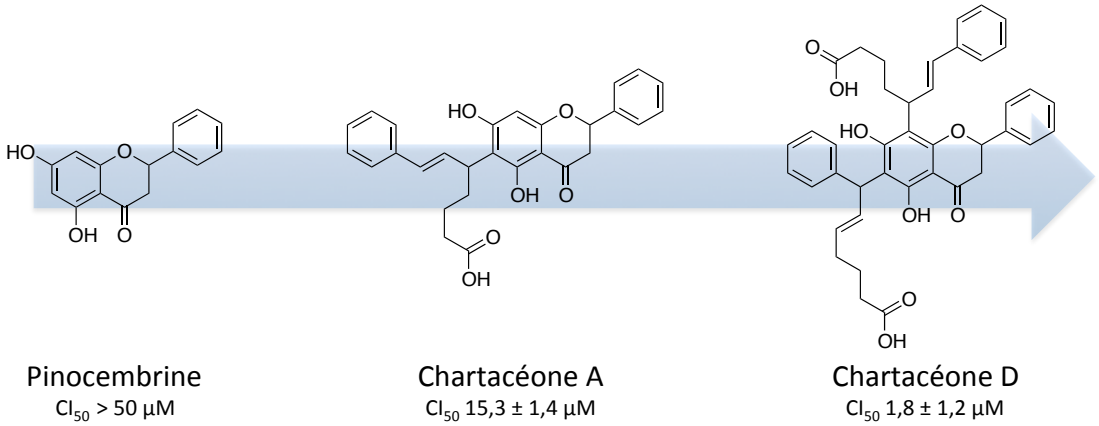



**Figure 90.** Influence des chaînes latérales des chartacéones sur l'inhibition de la NS5pol DENV

activité des chartacéones bi-substituées. Ainsi le NITD-29, un dérivé de l'acide *N*-sulfonylanthranilique, qui est le seul inhibiteur de la NS5 polymérase du DENV publié à ce jour, est fixé à son site d'action allostérique par la formation de liaisons hydrogènes entre son acide carboxylique et un résidu thréonine (Thr413) et entre sa fonction amide et un résidu arginine (Arg737) de la NS5 polymérase.[95,96] (Fig. 91) Il serait intéressant d'estérifier l'un puis l'ensemble des acides carboxyliques d'une chartacéone bi-substituée afin d'évaluer l'importance de leur rôle dans l'inhibition de la NS5.

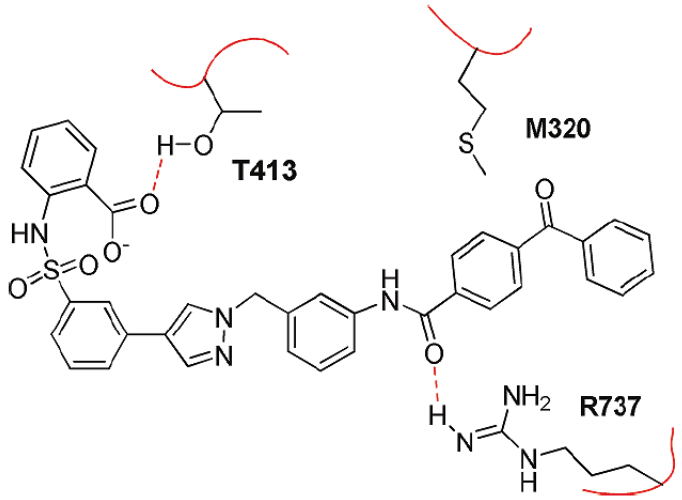



**Figure 91.** Liaisons hydrogènes formées par le NITD-29 au sein de son site d'action allostérique sur la NS5 polymérase du DENV

• La comparaison des $CI_{50}$ mesurées pour les chartacéones A1-A4 (**55-58**) montre quelques différences. Sans parler de stéréosélectivité, il semble que les chartacéones A2 (**56**) et A4 (**58**) présentent de meilleures $CI_{50}$ (facteur 2 à 3) que les chartacéones A1 (**55**) et A3 (**57**). Les chartacéones A2 et A4 ont en commun une configuration *(S)* du centre chiral en C-5″.

### 2.3.2 Sélectivité vis-à-vis d'autres polymérases virales

Afin d'étudier la spécificité des chartacéones vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV-2, leur activité inhibitrice est également évaluée vis-à-vis d'autres ARN-polymérases virales. Le West-Nile virus (WNV) appartient au même genre que le DENV, c'est un *Flavivirus*. Le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV) est un *Pestivirus* de la famille des Flaviviridae. Enfin, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un *Lentivirus* de la famille des Retroviridae.

Structuralement parlant, les ARN-polymérases de ces 3 virus sont de plus en plus éloignées de la polymérase du DENV dans l'ordre WNV, BVDV puis HIV. Les résultats biologiques obtenus sur ces polymérases sont résumés dans le tableau 9.

| Composé | | DENV polymérase | WNV polymérase | BVDV polymérase | HIV polymérase |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | ($CI_{50}$ en µM) | | |
| Chartacéone A | (**49**) | 14,8 ± 2,4 | 29,7 ± 2,4 | > 50 | nd |
| ◇ Chartacéone A1 | (**55**) | 15.3 ± 1.4 | 40.6 ± 2 | > 50 | nd |
| ◇ Chartacéone A2 | (**56**) | 9 ± 3.5 | 45.4 ± 2.2 | > 50 | 43 ± 2,8 |
| ◇ Chartacéone A3 | (**57**) | 27 ± 6.5 | 26.6 ± 0.9 | > 50 | > 109,2 |
| ◇ Chartacéone A4 | (**58**) | 7.4 ± 2.2 | 27.5 ± 1.5 | > 50 | nd |
| Chartacéone B | (**50**) | 72,5 ± 15,3 | 29,7 ± 3,7 | > 50 | nd |
| Chartacéone C | (**51**) | 4,2 ± 0,1 | 4,4 ± 0,3 | > 50 | nd |
| Chartacéone D | (**52**) | 1.8 ± 1.2 | 5.7 ± 0.6 | > 50 | > 75,7 |
| Chartacéone E | (**53**) | 2.9 ± 0.3 | 3.5 ± 0.3 | > 50 | nd |
| Chartacéone F | (**54**) | 2,4 ± 0,3 | 5,4 ± 0,1 | > 50 | nd |

**Tableau 9.** Sélectivité des chartacéones vis-à-vis de plusieurs ARN-polymérases virales

Dans le tableau 9, on remarque que l'activité inhibitrice des chartacéones vis-à-vis de la polymérase du WNV, bien que légèrement inférieure, est globalement équivalente à l'activité inhibitrice vis-à-vis de la polymérase du DENV. On retrouve la même amélioration de l'activité avec les chartacéones bi-substituées. On observe par contre une nette diminution de l'inhibition vis-à-vis des polymérases du BVDV et du HIV.

En conclusion, les chartacéones montrent une inhibition significative de l'ARN polymérase du DENV à des concentrations non-toxiques sur lignées cellulaires KB et MRC5. La présence des deux chaînes phénylheptenoïques est nécessaire pour une inhibition maximale de l'activité polymérase de la protéine NS5 du DENV. Enfin la sélectivité des chartacéones envers les polymérases des *Flavivirus* indiquent un mécanisme d'action spécifique.

# Conclusion de la Partie II

Dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'ARN polymérase du virus de la dengue, nous avons entrepris l'étude phytochimique de *Cryptocarya chartacea*, une Lauraceae néo-calédonienne. Ces travaux, menés sur l'extrait AcOEt des écorces de l'arbre, ont conduit à l'isolement de la pinocembrine (**48**), une flavanone connue et aux chartacéones A-F (**49-54**), une nouvelle famille de flavanones complexes mono ou bi-substituées par des chaînes latérales phénylheptenoïques.

Les chartacéones, qui sont les métabolites majoritaires de l'extrait, sont responsables de l'activité inhibitrice de l'ARN polymérase observée pour l'extrait brut. Évaluées sur un panel d'ARN polymérases virales, les chartacéones se sont montrées spécifiques des polymérases du genre *Flavivirus* (DENV et WNV), de plus, ces molécules exercent leur action inhibitrice à des concentrations non cytotoxiques (lignées cellulaires KB et MRC5). Les chartacéones C-F (**51-54**), avec des $CI_{50}$ comprises entres $1,8 \pm 1,2$ et $4,2 \pm 0,1$ µM sont plus actives que leurs analogues mono-substitués, les chartacéones A et B (**49-50**), indiquant l'importance de la présence de deux chaînes phénylheptenoïques pour l'activité inhibitrice. La nature de la chaîne, quant à elle, n'apparaît pas déterminante dans l'expression de l'activité.

Les chartacéones constituent une nouvelle classe d'inhibiteurs spécifiques de la NS5 polymérase du DENV, les seuls inhibiteurs allostériques connus étant les dérivés de l'acide *N*-sulfonylanthranilique (**26**).[95,96]

L'étude configurationnelle menée sur les chartacéones A1-A4 (**55-58**) a permis de déterminer leur configuration absolue par calcul théorique de leurs spectres de DC et comparaison avec les courbes expérimentales. Ces travaux, menés en étroite collaboration avec Marie-Élise Tran Huu Dau, du service de modélisation moléculaire, permettent aujourd'hui, à l'ICSN, de proposer une méthode alternative à la détermination des configurations absolues particulièrement adaptée aux substances d'origine naturelle.

Nous verrons, dans la deuxième partie de ce mémoire, que l'application de cette méthode à des diterpènes de structure complexe a rendu possible la détermination de leur configuration absolue.

Troisième partie

# *Trigonostemon cherrieri* : Étude chimique et activités biologiques

La troisième partie de ce mémoire porte sur l'étude chimique et biologique de *Trigonostemon cherrieri* Veillon. Le genre est monospécifique en Nouvelle-Calédonie et l'espèce y est présente dans une portion restreinte de l'île. La sélection de cette espèce s'est faite sur la base de critères biologiques et chimiotaxonomiques.

Dans le premier chapitre, après avoir brièvement décrit la famille d'appartenance (Euphorbiaceae), nous nous intéresserons plus particulièrement au genre *Trigonostemon*. La composition chimique et particulièrement les métabolites de type diterpénoïdes daphnanes orthoesters (DDO), fréquemment retrouvés chez les *Trigonostemon*, seront décrits. Nous avons choisi de faire également porter cette étude bibliographique sur deux caractéristiques structurales retrouvées chez les composés isolés de *Trigonostemon cherrieri* : la présence d'une fonction orthoester et d'atomes de chlore. La section 1.3 s'attachera donc à donner une vue d'ensemble des différents orthoesters retrouvés chez les végétaux supérieurs et les activités biologiques des DDO seront décrites. La section 1.4, quant à elle, portera sur les composés organohalogénés. Ici, nous donnerons quelques exemples des diterpènes halogénés retrouvés chez des végétaux et nous nous intéresserons aux enzymes capables de biohalogénation.

Le deuxième chapitre est consacré aux travaux personnels. Après avoir présenté la méthodologie employée lors du fractionnement, nous décrirons l'isolement et la caractérisation structurale de 10 composés appartenant à la même série chimique et formant une nouvelle classe : les DDO halogénés. En référence au nom de l'espèce, nous avons nommé ces métabolites « trigocherrines » et « trigocherriolides ». Dans la section 2.2, nous proposons et discutons l'implication d'une enzyme particulière dans la biohalogénation de ces molécules. Les activités antivirales sur le DENV et la découverte fortuite d'une activité sur le CHIKV font l'objet de la dernière section.

# Chapitre 1

# Étude bibliographique

## Plan


1.1 La famille des Euphorbiaceae . . . . . **114**
1.1.1 Classification des Euphorbiaceae . . . . . 114
1.1.2 Répartition géographique . . . . . 115
1.1.3 Critères de reconnaissance . . . . . 115
1.1.4 Intérêt économique, utilisations traditionnelles et activités biologiques . . . . . 115
1.2 Le genre *Trigonostemon* et l'espèce *Trigonostemon cherrieri* Veillon **118**
1.2.1 Description botanique . . . . . 119
1.2.2 Utilisations traditionnelles . . . . . 123
1.2.3 Composition chimique du genre *Trigonostemon* . . . . . 123
1.2.4 Activités biologiques des métabolites secondaires du genre *Trigonostemon* . . . . . 128
1.3 Les orthoesters . . . . . **131**
1.3.1 Catégories d'orthoesters . . . . . 131
1.3.2 Activités biologiques des DDO . . . . . 136
1.4 Les composés organohalogénés . . . . . **142**
1.4.1 Importance et occurrence naturelle . . . . . 142
1.4.2 Intérêts et fonctions biologiques . . . . . 142
1.4.3 Diterpènes halogénés chez les végétaux supérieurs . . . . . 144
1.4.4 Biosynthèse des composés halogénés . . . . . 145

## 1.1 La famille des Euphorbiaceae

Les Euphorbiaceae forment une famille de plantes dicotylédones comprenant, selon la classification traditionnelle, plus de 8 000 espèces réparties en 300 genres. Elles constituent ainsi une des plus grandes familles de végétaux supérieurs.[186]

### 1.1.1 Classification des Euphorbiaceae

Les critères de classification des Euphorbiaceae n'ont cessé d'évoluer depuis la création de la famille en 1789 par A. L. de Jussieu. Une des classifications les plus employées est celle établie par Webster G. L..[187] Celui-ci divise la famille en 5 sous-familles et 49 tribus. Les 5 sous-familles de Webster (Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Phyllanthoideae et Oldfieldoiideae) sont groupées en deux ensembles. Ainsi, les trois premières sous-familles sont caractérisées par la présence d'un seul ovule par loge (uni-ovulée) alors que les deux dernières possèdent au moins deux ovules par loge (bi-ovulée). D'autres critères, comme la présence ou non de latex, ou le nombre de chromosomes permettent une classification plus approfondie.

Une classification plus récente,[188] basée sur le système de classification APG II, organise les Euphorbiaceae *sensu stricto* en 3 sous-familles :

- les Acalyphoideae
- les Crotonoideae
- les Euphorbioideae

186. Mwine, J. T. ; Damme, P. V. *J. Med. Plants Research*, **2011**, *5* 652–662.
187. Webster, G. L. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1994**, *81* 33.
188. Wurdack, K. et al. *Am. J. Bot.*, **2005**, *92* 1397.

### 1.1.2 Répartition géographique

La famille est cosmopolite. On retrouve les Euphorbiaceae dans les zones tropicales et tempérées (plutôt chaudes), elles sont absentes des régions polaires. (Fig. 92)

**Figure 92.** Répartition mondiale des Euphorbiaceae [1]

### 1.1.3 Critères de reconnaissance

Cette vaste famille, plutôt hétérogène du point de vue morphologique, est difficile à caractériser. Certains caractères sont cependant communs à la grande majorité des Euphorbiaceae :

- présence de latex (parfois irritant)
- fleurs unisexuées, réunies en inflorescences
- fruit qui est une capsule à déhiscence triple

### 1.1.4 Intérêt économique, utilisations traditionnelles et activités biologiques

La famille des Euphorbiaceae comprend plusieurs espèces d'importance économique majeure. Le ricin commun (*Ricinus communis*) permet l'obtention de l'huile de ricin, utilisée notamment pour ses propriétés lubrifiantes dans l'industrie aéronautique. Le manioc (*Manihot esculenta*) est une Euphorbiaceae originaire du bassin amazonien. Il est aujourd'hui cultivé et consommé dans toute la région intertropicale du globe pour ses

racines tubéreuses riches en amidon. Enfin, le caoutchouc est obtenu par transformation du latex d'*Hevea brasiliensis*. (Voir illustrations ci-dessous)

*Ricinus communis*[1]

*Manihot esculenta*[2]

*Hevea brasiliensis*[3]

D'autre part, les propriétés médicinales des Euphorbiaceae sont reconnues depuis fort longtemps. Il y a plus de 2000 ans, Euphorbus, le médecin du roi Juba de Numidie, utilisait le latex d'*Euphorbia resinifera* pour soigner diverses affections. Il donnera son nom à la famille.[189] Depuis, et partout dans le monde, les propriétés thérapeutiques des Euphorbiaceae sont reconnues.

Il faut noter que les Euphorbiaceae sont également connues pour leur toxicité. De nombreuses espèces (*Euphorbia scheffleri*, *E. tirucalli*, *E. poissonii*, *E. venenifica* ...) ont été rapportées comme étant ichtyotoxiques et toxiques pour les animaux domestiques et l'Homme.[186]

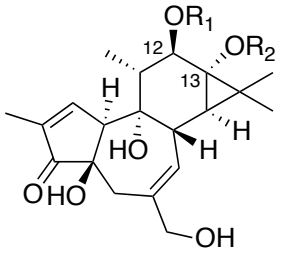
Parmi les substances toxiques présentes chez les Euphorbiaceae, on citera notamment la ricine. C'est une glycoprotéine retrouvée dans les graines de *Ricinus communis*. Avec une dose létale ($DL_{50}$) estimée entre 1 et 20 $mg\,kg^{-1}$ chez l'homme, la ricine est l'un des toxiques les plus puissants isolé de végétaux.[190] *Jatropha curcas* et *Croton tiglium* produisent également des toxoalbumines (la curcine et la crotine, respectivement)

1. `http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-257.jpg`
2. `http://2.bp.blogspot.com/_tRWjcDi_XbI/SYN894IxVCI/AAAAAAAAFs0/BOn9aIw_hXw/s1600/cassava.jpg`
3. `http://cofpi.c.o.pic.centerblog.net/o/4a051756.jpg`

189. Lovell, C. *Clin. Dermatol.*, **1998**, *16* 33–40.
190. Sehgal, P. et al. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48* 3171–6.

proches de la ricine.[191]

Les esters de phorbol constituent une autre classe de substances toxiques retrouvée chez bon nombre d'Euphorbiaceae.




Phorbol $R_1=R_2=H$
PMA $R_1=C_{13}H_{27}CO$, $R_2=CH_3CO$
PDBu $R_1=R_2=C_3H_7CO$

**Figure 96.** Phorbol et esters de phorbol (PMA et PDBu) retrouvés chez des Euphorbiaceae

Le phorbol est un diterpène tétracyclique de squelette tigliane. Les esters de phorbols sont définis comme étant des composés polycycliques dont deux groupements hydroxyles portés par des carbones vicinaux ont été estérifiés par des acides gras.[192] On voit Fig 96 la structure du phorbol et celles de deux esters de phorbol, le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) et le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu). Les esters de phorbol miment l'action du diacyl glycérol (DAG), un activateur de la protéine kinase C (PKC) qui régule différentes voies de transduction du signal ainsi que d'autres voies métaboliques. En activant la PKC, les esters de phorbols exercent une activité promotrice de tumeur. Non carcinogènes par eux-même, ils amplifient l'effet mutagène d'un carcinogène co-administré.[193] Les esters de phorbol sont retrouvés chez des plantes de la famille des Thymelaeaceae et chez un grand nombre d'Euphorbiaceae.[192,194]

191. Stirpe, F et al. *Biochemical J.*, **1976**, *156* 1–6.
192. Goel, G. et al. *Int. J. Toxicol.*, **2007**, *26* 279–88.
193. Blumberg, P. *Cancer Res.*, **1988**, *48* 1.
194. Beutler, J. A. et al. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1996**, *83* 530.

## 1.2 Le genre *Trigonostemon* et l'espèce *Trigonostemon cherrieri* Veillon

Le genre *Trigonostemon* est constitué d'une petite centaine d'espèces. On le retrouve en Asie du sud-est, de l'Inde au nord de l'Australie en passant par la Chine, le Vietnam, le Sri-Lanka et la Nouvelle-Guinée.[195] (Fig. 97)

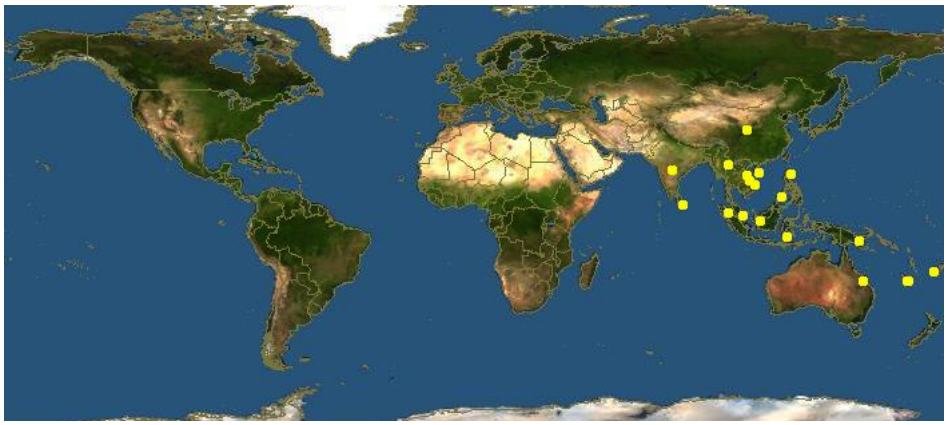


**Figure 97.** Répartition globale du genre *Trigonostemon* [1]

*Trigonostemon cherrieri* Veillon[196] a été découvert en 1990, par des botanistes de l'IRD, dans une propriété privée de la région de Poya, sur la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie. Le genre est monospécifique dans l'île et l'espèce, endémique, n'y pousse que dans une surface de 0,36 km$^2$. Le Programme de Conservation des Forêts Sèches (PCFS) de Nouvelle-Calédonie a financé la pose d'une clôture le long d'une portion boisée de 0,14 km$^2$ ce qui permet de protéger une petite moitié de la population néo-calédonienne vis-à-vis du bétail, des cerfs et des cochons sauvages qui impactent fortement les forêts sèches de la côte Ouest de l'île. Ce biotope fait sans doute partie des écosystèmes les plus menacé de la planète. De par leur propension à devenir des aires de pâturages et leur susceptibilité aux incendies, l'étendue des forêts sèches tropicales a beaucoup diminué. En Nouvelle-Calédonie, elles ont été rasées au profit de l'agriculture et il ne reste aujourd'hui que 2% de la surface originelle occupée par la forêt sèche.

195. Chantaranothai, P. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, **2005**, *33* 21–31.

1. `http://www.discoverlife.org`

196. VEILLON, J.-M. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. Section B, Adansonia*, **1992**, *14* 55–60.

*Trigonostemon cherrieri* est répertorié comme une espèce en danger critique de disparition par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN). [1] (Fig 98)

**Figure 98.** Répartition de l'espèce *Trigonostemon cherrieri* en Nouvelle Calédonie [1]

### 1.2.1 Description botanique

Le genre *Trigonostemon* est difficile à décrire botaniquement de par la grande variabilité de la structure de ses inflorescences, ainsi que la variabilité morphologique de la forme et de la taille de ses feuilles. Le genre *Trigonostemon* est proche du genre *Dimorphocalyx* duquel il diffère par le nombre d'étamines (3-5 contre 10-15) et son caractère monoïque.[195] Il a d'abord été classé dans la tribu des Jatropheae puis, plus récemment, dans une nouvelle tribu crée par Webster,[187] les Trigonostemoneae, qui ne contient qu'un seul genre. Aujourd'hui, les travaux de systématique moléculaire de Wurdack *et al.* classent le genre dans la sous-famille des Crotonoideae.[188]

#### 1.2.1.1 Le genre *Trigonostemon*

Les espèces du genre *Trigonostemon* sont généralement des buissons ou de petits arbres, monoïques. Les feuilles sont disposées selon un arrangement spiralé, rarement subopposées, à l'extrémité des rameaux. Elles sont habituellement trinervées à la base. Les inflorescences en grappes d'épis ou de panicules et plus rarement en cymes, sont bisexuées, elles sont disposées de façon axillaire ou terminale. Les fleurs vont du violet foncé au blanc en passant par le jaune-orangé. Le disque est habituellement entier, annulaire ou cupulaire; ou composé de 5 glandes libres. Les fleurs mâles sont composées

1. `http://www.iucnredlist.org`

de 5 sépales, 3 ou 5 pétales et 3 ou 5 étamines dont le filet est soudé en colonne, le pistillode est absent. Les fleurs femelles sont composées de 5 sépales et de 3 ou 5 pétales. L'ovaire est 3-loculaire, 3-lobé et il y a un ovule par locule. Le style est bifide ou doublement bifide. Le fruit est une capsule 3-lobée, glabre ou pubescente à déhiscence triple. Les graines sont ovoïdes ou globuleuses.[195]

*T. heterophyllus* *T. xyphophilloides* *T. lii*

**Figure 99.** Fleurs de différentes espèces du genre *Trigonostemon*[1]

#### 1.2.1.2 L'espèce *Trigonostemon cherrieri*

*Trigonostemon cherrieri* est un arbrisseau de 1 à 2 m, buissonnant, mais peut, plus rarement, atteindre les 5 m de hauteur. L'écorce est grisâtre et fine. Les feuilles sont alternes et concentrées vers l'extrémité des rameaux. Elles présentent un limbe elliptique, lancéolé ou ovale de 1,5-8 × 0,8-3,5 cm, arrondi à l'extrémité ou parfois plus ou moins émarginé. Deux glandes sont visibles sous les feuilles de part et d'autre du point d'insertion du pétiole. Les inflorescences sont des grappes composées, pauciflores, avec 1 à 5 ramifications. Elles sont unisexuées ou monoïques, les fleurs mâles étant alors localisées de préférence vers la base de la grappe. Les grappes mâles sont dressées, plus courtes que les feuilles et souvent portées par des brachyloblastes à l'extrémité des rameaux. Les grappes femelles sont plus amples, pendantes, de même longueur que les feuilles ou les dépassant nettement, pouvant alors atteindre les 10 cm de longueur. Les fleurs mâles sont composées de 5 sépales très courtement connés à la base, imbriqués, triangulaires, bombés et velus extérieurement, longs de 1-1,5 mm, larges de 0,8-1 mm; de 5 pétales libres, imbriqués, plus ou moins elliptiques, longs de 4-5 mm, larges de 2-3 mm entièrement glabres, bilobés au sommet, récurvés à ce niveau, d'abord jaune pâle sur le frais, virant ensuite à l'orange. Le filet des étamines est soudé en colonne sur une

1. `http://www.plant.csdb.cn`

hauteur de 1,7 mm puis divergeant au sommet au niveau des anthères; ces dernières sont extrorses avec 4 sacs polliniques à déhiscence longitudinale. La fleur femelle présente des sépales et pétales identiques à la fleur mâle. L'ovaire, à 3 loges uniovulées, est couvert de quelques poils épars, les styles subulés sont d'abord soudés en colonne puis divergents et fourchus au sommet, les stigmates sont plus ou moins en massue. Les fruits sont des capsules tricoques, bivalves et lisses extérieurement. Les graines, trigones, présentent un péricarpe lisse et un albumen épais.[196] (Fig. 100 et 101)

Fleurs femelles

Fruit

Feuillage

Écorce

**Figure 100.** Différentes parties de *Trigonostemon cherrieri*[1]

1. Photos : V. Dumontet

Fig. 1. — **Trigonostemon cherrieri** Veillon : **1**, rameau florifère ♂ × 1 ; **2**, rameau florifère ♀ × 4/5 ; **3**, feuille adulte × 2/3 ; **4**, détail de la nervation ; **5**, détail des 2 petites glandes à la base de la feuille ; **6**, fleur ♀ × 7 ; **7**, pétale × 10 ; **8**, colonne staminale × 14 ; **9**, ovaire et styles × 14 ; **10**, **11**, capsule : profil et face inférieure × 3 ; **12**, capsule : coupe transversale × 3 ; **13**, **14**, **15**, aspects de la graine × 6.

**Figure 101.** Planche botanique de l'espèce *Trigonostemon cherrieri*[196]

### 1.2.2 Utilisations traditionnelles

*Trigonostemon reidioides* Craib. est employé dans la médecine traditionnelle thaïlandaise. L'extrait aqueux des racines est vomitif et est employé lors d'intoxication par des champignons vénéneux. En application externe, l'extrait présente des propriétés antiseptiques.[197] Cette espèce est également utilisée comme antivenin lors de morsures par le cobra Thaï (*Naja kaouthia*).[198]

Plusieurs espèces du genre *Trigonostemon* sont employées comme remèdes traditionnels dans la province du Yunnan (Chine) pour combattre l'asthme ou la diarrhée.[199]

### 1.2.3 Composition chimique du genre *Trigonostemon*

Les études phytochimiques portant sur le genre *Trigonostemon* ont commencé il y a une vingtaine d'années. Depuis l'isolement de la trigonostémone (**63**) de *T. reidioides*[200] en 1990, 74 métabolites secondaires ont été isolés de ce genre. Au total, 6 espèces de *Trigonostemon* ont été étudiées : *T. reidioides*, *T. lii*, *T. chinensis*, *T. thyrsoideum*, *T. xyphophylloides* et *T. howii*. L'étude de ce genre a suscité un intérêt croissant dans ces trois dernières années (2009-2011) avec 14 publications sur un total de 21.

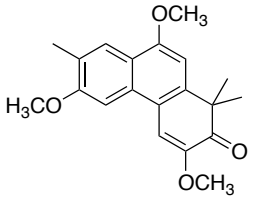
On peut globalement classer les composés isolés de *Trigonostemon* en 3 grandes familles : les dérivés du phénanthrène, les alcaloïdes et les diterpènes. Les diterpènes sont incontestablement majoritaires (55 composés sur 74 isolés) et, parmi ceux-ci, la plus grande partie (46/55) présente un squelette daphnane. On les nommera Diterpénoïdes de type Daphnane (DD). Parmi ceux-ci, on observe fréquemment un type structural caractéristique que l'on retrouve exclusivement chez les Euphorbiaceae et les Thymelaeaceae : les Diterpénoïdes Daphnane Orthoester (DDO).[201] Le motif orthoester, qui se caractérise par le rattachement de trois fonctions alkoxy au même carbone quaternaire, est présent chez plus de trois-quart des daphnanes isolés du genre *Trigonostemon*.

Dans les prochaines pages, nous présenterons quelques exemples représentatifs de chaque classe des métabolites secondaires de ce genre.

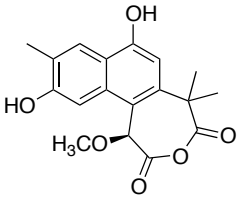
197. Kanchanapoom, T. et al. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43* 2941–2943.
198. Utsintong, M. et al. *Chem. Biodivers.*, **2009**, *6* 1404–14.
199. Li, S.-F. et al. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52* 3186–3188.
200. Kokpol, U. et al. *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53* 1148–1151.
201. Liao, S.-G. et al. *Chem. Rev.*, **2009**, *109* 1092–140.

#### 1.2.3.1 Phénanthrènes du genre *Trigonostemon*

La trigonostémone (**63**), isolée de *T. reidioides*, est le premier composé a avoir été isolé du genre.[200] La thrigonosomone A (**64**) est un dérivé du phénanthrène présentant un anhydride cyclique à 6 carbones, elle a été isolée des racines et tiges de *T. lii*.[202]



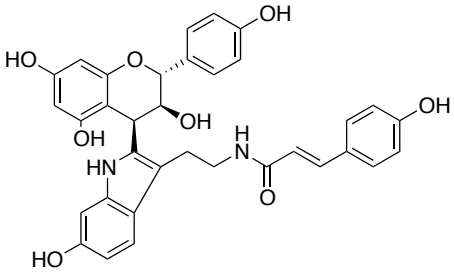

Trigonostémone (**63**)



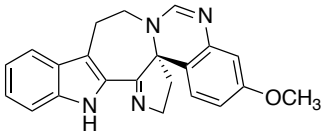

Thrigonosomone A (**64**)

#### 1.2.3.2 Alcaloïdes du genre *Trigonostemon*

Les alcaloïdes isolés de ce genre présentent des structures tout à fait intéressantes. On peut citer la lotthanongine (**65**) isolée de *T. reidioides*.[197] Ce composé fait partie de la petite dizaine d'alcaloïdes flavoniques isolés de végétaux supérieurs. La trigonoliimine A (**66**), un alcaloïde indolique isolé des feuilles de *T. lii*, présente elle aussi une structure polycyclique particulière.[203] La configuration absolue des trigonoliimines A-C a été récemment révisée après synthèse totale des produits naturels.[204]




Lotthanongine (**65**)



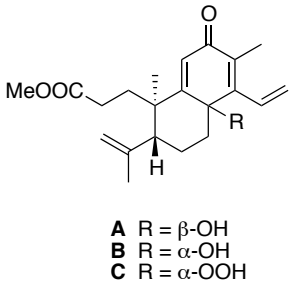

Trigonoliimine A (**66**)

#### 1.2.3.3 Diterpénoïdes du genre *Trigonostemon*

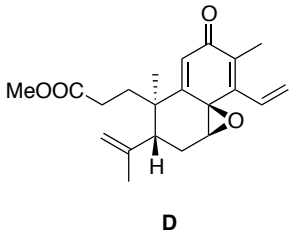
**Diterpènes non-daphnane** Pour les diterpènes non-daphnane, on notera les trigochinènes A-D (**67-70**) isolés des parties aériennes de *T. chinensis* et leur squelette

202. Hu, X.-J. et al. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50* 2917–2919.
203. Tan, C.-J. et al. *Org. Lett.*, **2010**, *12* 2370–3.
204. Kim, J. ; Movassaghi, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *6* 10768–10771.

3,4-*seco*-cleistanthanique.[205]




Trigochinènes A-C (**67**-**69**)




Trigochinène D (**70**)

**Diterpénoïdes Daphnane (DD)** La famille des Euphorbiaceae est connue pour la diversité chimique de ses constituants isoprèniques et particulièrement pour ses diterpènes de squelettes variés : jatrophanes, lathyranes, tiglianes, ingénanes, myrsinols, etc.[206] Dans le genre *Trigonostemon*, c'est le squelette daphnane qui est rencontré de façon prépondérante. (Fig. 102)

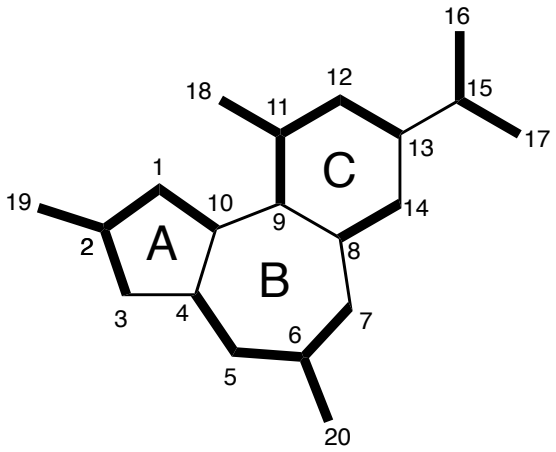


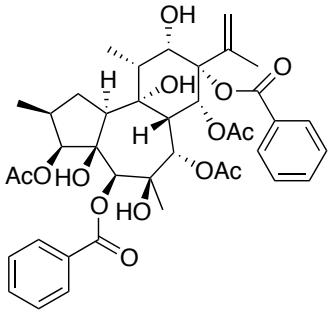

**Figure 102.** Le squelette daphnane et la numérotation conventionnelle. En gras, les unités isoprènes.

▶ **Diterpénoïdes Daphnane (DD)**

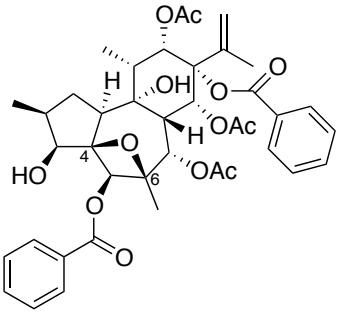
La trigohownine I (**71**), isolée des tiges de *T. howii*[207] et la trigochinine A (**72**)

205. Yin, S. et al. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71* 1414–1417.
206. Shi, Q. et al. *Chem. Rev.*, **2008**, *108* 4295–4327.
207. Dong, S.-H. et al. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74* 1255–61.

extraite des parties aériennes de *T. chinensis*[208] sont des exemples de DD présents dans ce genre. On notera la forte oxygénation de ces diterpènes, une caractéristique que l'on retrouve chez tous les DD de *Trigonostemon*. La trigochinine A (**72**) présente un cycle oxétane en 4,6, motif peu commun chez les DD.




Trigohownine I (**71**)




Trigochinine A (**72**)

**▶ Diterpénoïdes Daphnane Orthoester (DDO)**

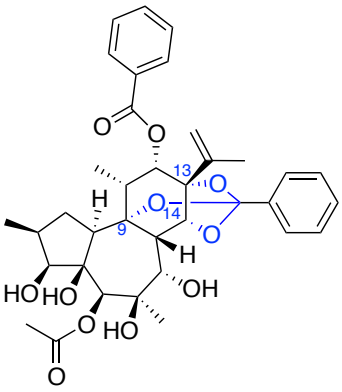
Les DDO forment une classe de composés tout à fait intéressants du point de vue structural et certains d'entre eux sont dotés de propriétés biologiques remarquables. Nous décrirons de façon plus approfondie cette classe de composés et leurs propriétés biologiques dans la section 1.3.

Le motif orthoester est défini par le rattachement de trois fonctions alkoxy au même atome de carbone. Chez les DDO, la fonction orthoester est systématiquement retrouvée sur le cycle C. De plus, la plus grande partie des DDO sont substitués par la fonction orthoester en position 9,13,14, seul un petit nombre, restreint au genre *Trigonostemon*, sont substitués en 9,12,14 ou en 12,13,14. Les trois types de substitutions peuvent se retrouver chez *Trigonostemon*.

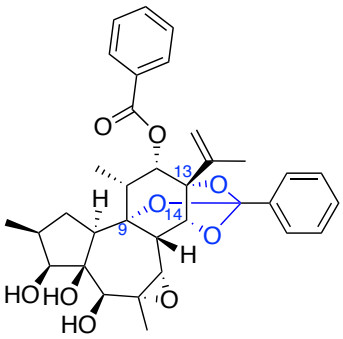
• **9,13,14-orthoesters** L'étude de *T. thyrsoideum* a permis l'isolement de DDO présentant un motif 9,13,14-orthoester. Les tiges contiennent la trigonothyrine F (**73**),[209] alors que l'étude des racines a mis en évidence la présence de la trigonosine A (**74**).[210]

• **9,12,14-orthoesters** On peut observer la substitution en 9,12,14 chez bon nombre de DDO de *Trigonostemon*. A titre d'exemple, la trigoxyphine D (**75**) isolée des tiges

208. Chen, H.-D. et al. *Org. Lett.*, **2010**, *12* 1168–71.
209. Li, S.-F. et al. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74* 464–9.
210. Zhang, L. et al. *Phytochemistry*, **2010**, *71* 1879–1883.

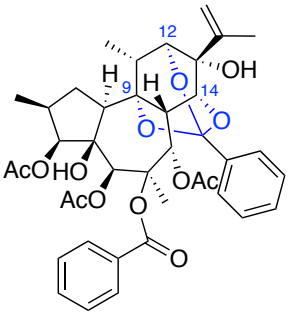


Trigonothyrine F (**73**)

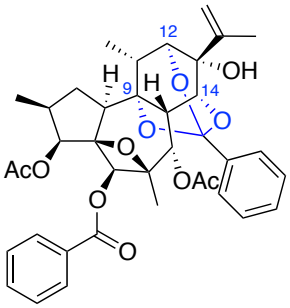


Trigonosine A (**74**)

de *T. xyphophilloides*[211] ou encore la trigochinine C (**76**) retrouvée dans les parties aériennes de *T. chinensis*.[208]



Trigoxyphine D (**75**)

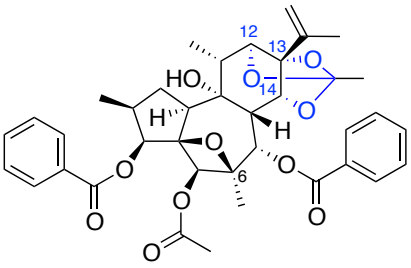


Trigochinine C (**76**)

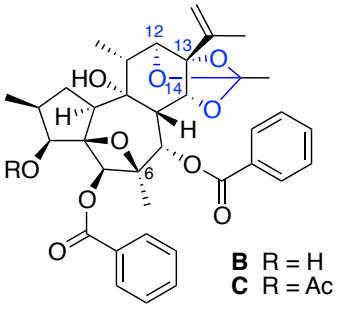
Il est intéressant de constater qu'une substitution par un orthoester en position 9,12,14 conduira à une conformation en chaise du cycle C.[212] Lors du cas plus classique (pour le reste des DDO) d'une substitution en 9,13,14, ce cycle C adopte une conformation bateau.[213]

• **12,13,14-orthoesters** Les trigonothyrines A-C (**77-79**) sont les seuls DDO a présenter une substitution en 12,13,14 par un orthoester. Ils ont été isolés des tiges de *T. thyrsoideum*.[214] Leur configuration en C-6 a été corrigée par la suite.[208]

211. Lin, B.-D. et al. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73* 1301–5.
212. Jayasuriya, H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122* 4998–4999.
213. Walpole, C. S. et al. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39* 2939–52.
214. Zhang, L. et al. *Org. Lett.*, **2010**, *12* 152–5.



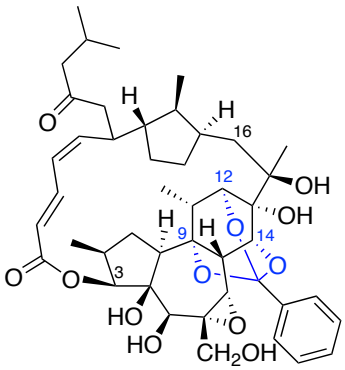
Trigonothyrine A (**77**)



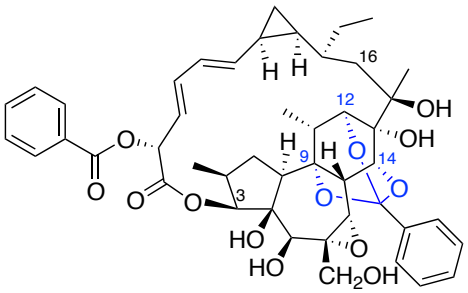

Trigonothyrines B et C (**78** et **79**)

**▶ Diterpénoïdes Daphnane Orthoester Macrocycliques (DDOM)**

Les DDO Macrocycliques (DDOM) sont les premiers DDO à avoir été isolés du genre *Trigonostemon*.[212] Ces DDOM sont caractérisés par une substitution en 9,12,14 par l'orthoester ainsi que par un cycle macrolactonique formé par l'extension d'une chaîne polycétidique à 12 carbones entre le C-16 et le C-3. Le rediocide A (**80**), isolé des parties aériennes de *T. reidioides*[212] et le trigochilide A (**81**), isolé des parties aériennes de *T. chinensis*,[215] font partie de cette classe de composés.



Rediocide A (**80**)



Trigochilide A (**81**)

### 1.2.4 Activités biologiques des métabolites secondaires du genre *Trigonostemon*

Le tableau 10 résume l'ensemble des activités biologiques observées pour les métabolites secondaires isolés du genre *Trigonostemon*. On retiendra notamment l'activité insecticide exceptionnelle des rediocides A-E envers la puce commune *Ctenocephalides*

215. Chen, H.-D. et al. *Org. Lett.*, **2009**, *11* 4080–3.

*felis*. Ces DDOM ont montrés des $DL_{90}$ [1] comprises entre 0,25 et 1 ppm (10 ppm pour la molécule de référence, l'ivermectine).[212,216].

On soulignera également l'activité antivirale marquée des trigonothyrines C (**79**) et F (**73**) vis-à-vis des effets cytopathiques induits par HIV-1 sur les lignées cellulaires C8166 (Lymphocytes T). Les $EC_{50}$ observées sont respectivement de 2,19 et 0,13 $\mu g\,ml^{-1}$ avec de bons index thérapeutiques, respectivement TI $> 90$ et $> 75$.[210,214]

1. $DL_{90}$ ou dose léthale 90, soit la dose nécessaire à la mort de 90% des puces.

216. Jayasuriya, H. et al. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67* 228–31.

**Tableau 10.** Activités biologiques des composés isolés du genre *Trigonostemon*

| Espèce | Classe de composé | Composé | Activité biologique | Référence |
|---|---|---|---|---|
| *T. chinensis* | Diterpènes (seco-cleistanthane) | Trigonochinenes A-E | Antibactériens | [205] |
| | DDOM (9,12,14) | Trigochilides A et B | Cytotoxicité modérée | [215] |
| | DD | Trigochinines A-B | Inhibiteurs MET tyrosine kinase | [208] |
| | DDO (9,12,14) | Trigochinine C | *id.* | |
| | DD | Trigochinines D-F | Cytotoxicité modérée | [217] |
| | DDO (9,13,14) | Trigochinines G-I | *id.* | |
| | Dinorditerpénoïdes | Trigonostemons A-D | ND. | [218] |
| | Phenanthrénone | Trigonostemon E | *id.* | |
| | Alcaloïde (bis-indole) | Trigonostemon F | *id.* | |
| *T. howii* | DDO (9,12,14) | Trigohownines A-C | Cytotoxicité modérée | [207] |
| | DDO (9,13,14) | Trigohownines D et E | *id.* | |
| | DD | Trigohownines F-I | *id.* | |
| *T. lii* | Alcaloïdes ($\beta$-carbolines) | Trigonostemonines A-F | ND. | [219] |
| | Phénanthrènes | Thrigonosomone A-B | ND. | [202] |
| | Phénanthrènone | 6,9-O-dedimethyltrigonostémone | *id.* | |
| | Alcaloïdes (indoles) | Trigonoliimines A-C | Anti-HIV modérée | [203] |
| | Alcaloïdes | Trigonoïnes A and B | Anti-HIV modérée | [199] |
| *T. reidioides* | Phenanthrénone | Trigonostémone | ND. | [200] |
| | DDOM (9,12,14) | Rediocide A | Insecticide puissant | [212] |
| | Alcaloïde flavonique | Lotthanongine | ND. | [197] |
| | DDOM (9,12,14) | Rediocides B-E | Insecticide puissant | [216] |
| | DDOM (9,12,14) | Rediocide F | Acaricide puissant | [220] |
| | DDOM (9,12,14) | Rediocide G | Cytotoxique | [221] |
| | DDOM | Rediocides A et G | Antitoxine (venin de cobra) | [198] |
| *T. thyrsoideum* | DDO (12,13,14) | Trigonothyrines A-C | Anti-HIV | [214] |
| | DD | Trigonothyrines D-E | Anti-HIV | [210] |
| | DDO (9,13,14) | Trigonothyrines F-G | *id.* | |
| | DDO (9,13,14) | Trigonosines A-C | Non toxiques sur lignées | [209] |
| | DD | Trigonosine D | cancéreuses humaines | |
| | DDOM (9,12,14) | Trigonosines E et F | (HL-60, A549 et MCF-7) | |
| *T. xyphophylloides* | DDO (9,13,14) | Trigoxyphines A-C et F | Cytotoxique (Trigoxyphines A et B) | [211] |
| | DDO (9,12,14) | Trigoxyphines D et E | (HL60 et A549) | |
| | Phénanthrène | Trigoxyphine G | | |

## 1.3 Les orthoesters

Comme nous l'avons vu, un bon nombre de diterpènes de type daphnane isolés du genre *Trigonostemon* présentent une fonction orthoester. Dans cette section, nous évoquerons plus en détail la nature de cette fonction chimique particulière, les grandes classes de métabolites secondaires des végétaux chez lesquels ont retrouve cette fonction ainsi que les activités biologiques importantes exercées par ces métabolites.

### 1.3.1 Catégories d'orthoesters

Globalement, il semble que la présence du groupement orthoester soit restreinte à un petit nombre de familles chimiques, principalement : les diterpènes de type daphnane, les limonoïdes de type phragmaline et les dérivés stéroïdiques de type bufadiénolide et ergostanoïde.

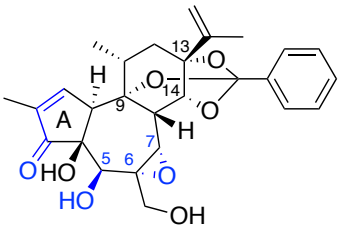
#### 1.3.1.1 DDO

Avec près de la moitié des quelques 300 orthoesters d'origine végétale identifiés à ce jour, les Diterpènoïdes Daphnane Orthoesters ou DDO constituent la plus grande catégorie d'orthoesters. Ébauchée par De Kimpe,[222] puis revue par Liao,[201] la classification des DDO est basée sur les substitutions et fonctionnalisations des cycles A, B et C du noyau daphnane. Elle permet de distinguer 6 grandes classes de DDO.

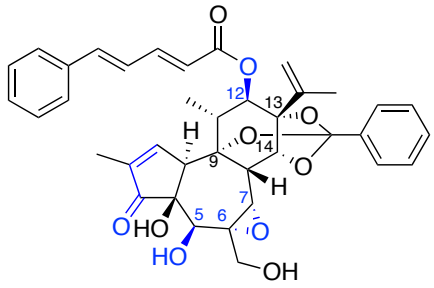
**Daphnetoxine** La première classe de DDO, caractérisée par la daphnetoxine (**82**) isolée de *Daphne mezereum*,[223] présente une cétone $\alpha,\beta$-insaturée au niveau du cycle A, un OH en position 5-$\beta$ ainsi qu'une fonction époxyde en 6$\alpha$,7$\alpha$. On retrouve une vingtaine d'orthoesters de cette classe chez les Thymelaeaceae comme chez les Euphorbiaceae. Ces orthoesters sont présents dans les racines, les tiges et les fleurs de ces espèces et semblent particulièrement abondants dans le latex.

**12-hydroxydaphnetoxine** La seconde classe est constituée par les 12-hydroxydaphnetoxines. Ces composés présentent les mêmes caractéristiques que la première classe avec la présence additionnelle d'un oxygène en position 12. Le premier composé de ce genre à

222. He, W. et al. *Mini-Rev. Med. chem.*, **2002**, *2* 185–200.
223. Stout, G. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92* 1070–1071.



Daphnetoxine (**82**)



Mézéréine (**83**)

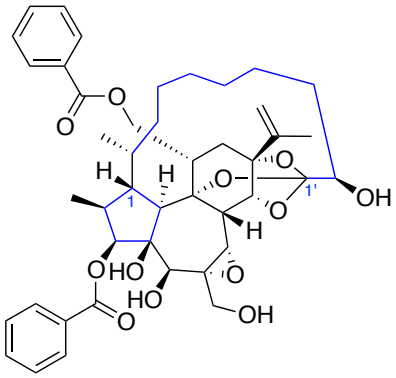
avoir été isolé est la mézéréine (**83**) des graines de *Daphne mezereum*.[224] Une soixantaine de DDO entrent dans cette classe. La famille des Thymelaeaceae et plus particulièrement le genre *Daphne* semblent riche en 12-hydroxydaphnetoxines. L'observation des DDO isolés du genre *Trigonostemon* nous permet de classer les trigochinines G-I,[217] les trigonosines A (**74**), B et C[209] et les trigoxyphines A et B[211] dans la classe des 12-hydroxydaphnetoxines.

**1-alkyldaphnanes** Une trentaine de DDO présentant un cycle A saturé et un macrocyle entre le carbone 1 du cycle A et l'orthoester forment la classe des 1-alkyldaphnanes. La gnidimacrine (**84**) isolées des feuilles de *Gnidia subcordata*[225] est un exemple d'alkyldaphnane.

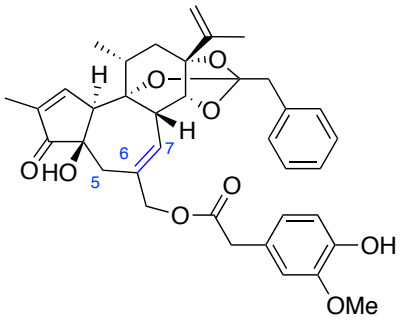
**Résinoferoïdes** Les résinoferoïdes sont des dérivés 5-deoxy et 6,7-insaturé des daphnetoxines. Jusqu'à présent, seul 4 représentants, isolés uniquement du genre *Euphorbia*, ont été décrits. La résiniferatoxine (RTX) (**85**), isolé initialement du latex de *Euphorbia resinifera*,[226] intéresse énormément les pharmacologues pour ses propriétés agonistes des TRVP1 (Transcient Receptor Potential Vanilloid).

**Genkwanines** Contrairement aux classes précédentes qui présentent un époxyde ou une double liaison en position 6,7, les genkwanines présentent un motif 6,7-dihydroxyle. Seul neuf produits composent cette classe. Comme la genkwanine A (**86**), tous sont isolés des inflorescences de *Daphne genkwa*.[227] Il est cependant possible d'y adjoindre les

224. Ronlán, A ; Wickberg, B *Tetrahedron Lett.*, **1970**, *11* 4261–4.
217. Chen, H.-D. et al. *Tetrahedron*, **2010**, *66* 5065–5070.
225. Kupchan, S. M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98* 5719–5720.
226. Hergenhahn, M et al. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16* 1595–1598.
227. Zhan, Z.-J. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13* 645–55.



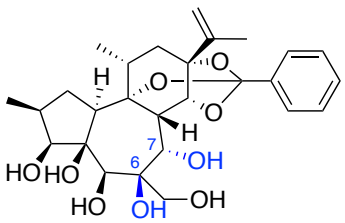
Gnidimacrine (**84**)



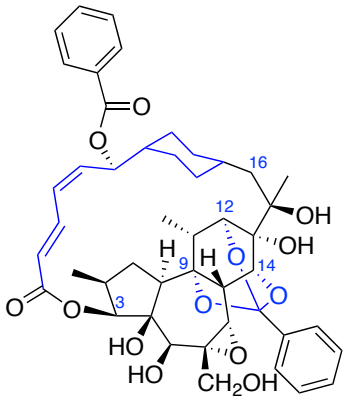
Resiniferatoxine (**85**)

trigohownines D et E,[207] la trigoxyphine F,[211] la trigonosine C[209] et les trigonothyrines F et G.[210] Ces composés ne présentant en effet ni époxyde, ni double liaison en 6,7 mais bien 2 fonctions oxygénées.

**Rediocides** Enfin, la sixième classe proposée par Liao *et al.* est constituée par les DDOM de type rediocides. Ces composés sont caractérisés par une substitution en 9,12,14 par l'orthoester contrairement aux 5 classes précédentes toutes substituées en 9,13,14. L'autre particularité de cette classe est la présence d'une macrolactone en C-3 formée par une chaine polycétidique à 12 carbones entre le C-16 et le C-3. En plus des rediocides - ci-dessous le rediocide G (**87**) - on pourra y classer les trigochilides A (**81**) et B isolés de *T. chinensis*[215] ainsi que les trigonosines E et F de *T. thyrsoideum*.[209]



Genkwanine A (**86**)

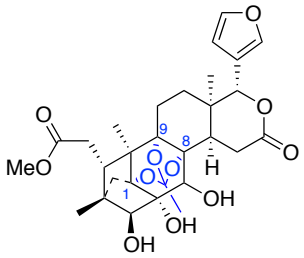


Rediocide G (**87**)

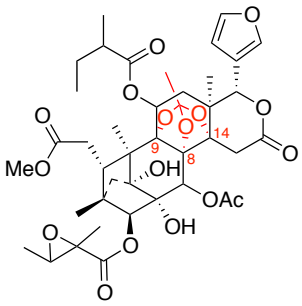
La classification proposée par Liao *et al.* est incomplète, en effet, l'observation des

DDO du genre *Trigonostemon* montre que plusieurs d'entre eux (les trigoxyphines D (**75**) et E[211], les trigohownines A à C[207], la trigochinine C (**76**) et les trigonothyrines A à C (**77-79**)[214]) n'entrent dans aucune des 6 catégories décrites. La difficulté de classer ces produits réside sans doute dans le grand nombre de catégories possibles si l'on considère trop de fonctionnalités chimiques différentes.

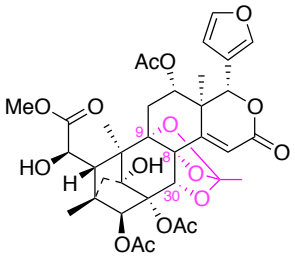
### 1.3.1.2 Limonoïdes



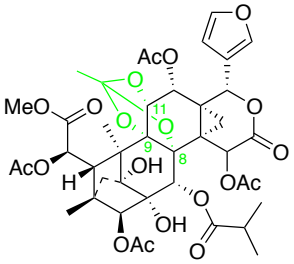

Phragmaline (**88**)




Utiline (**89**)




Xyloccensine S (**90**)




Tabularisine A (**91**)

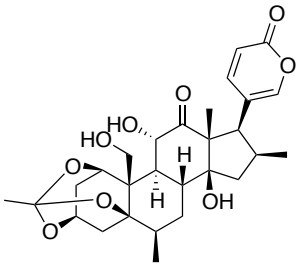
**Figure 123.** Substitutions des limonoïdes orthoesters

Les limonoïdes forment une famille homogène de tétranortriterpènoïdes, on les retrouve fréquemment chez les Rutaceae et les Méliaceae. Les limonoïdes orthoesters présentent tous un squelette de type phragmaline et on les retrouve exclusivement dans deux tribus des Meliaceae : les Swietenieae et les Xylocarpeae. Les limonoïdes orthoesters peuvent être divisés en 4 classes en fonction du motif de la substitution par l'orthoester. On observera ainsi l'orthoester en position 1,8,9 (ex. : phragmaline (**88**) isolée de *Chukrasia tabularis*[228]), en 8,9,14 (ex. : utiline (**89**) isolée de *Carapa procera*[229]), en

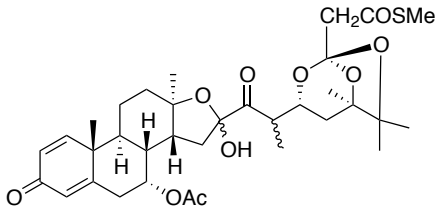
228. Connolly, J. D. et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1978** 285.
229. Akisanya, A. et al. *J. Chem. Soc.*, **1960** 3827.

8,9,30 (ex. : xyloccensine S (**90**) isolée de *Xylocarpus granatum*[230]) ou encore en position 8,9,11 (ex. : tabularisine A (**91**) isolée de *Chukrasia tabularis*[231]). (Fig. 123)

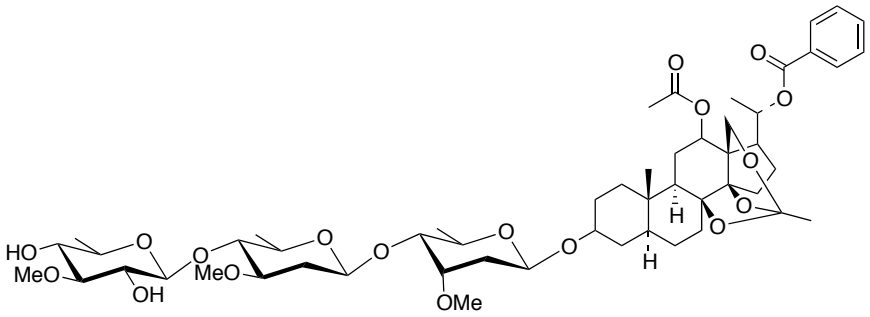
#### 1.3.1.3 Stéroïdes



Bryotoxine B (**92**)



Pétuniastérone N (**93**)



Orthoester de type pregnane de *Dregea sinensis* (**94**)

Les orthoesters stéroïdiques peuvent être divisés en 3 classes en fonction de la nature de leur squelette stéroïdique.

**Bufadiénolides orthoesters :** les orthoesters de type bufadiénolide comme la bryotoxine B (**92**) de *Briophyllum tubiflorum*.[232] Ce type d'orthoester est rencontré chez deux familles : les Crassulaceae et les Melianthaceae.

**Ergostane orthoester :** les orthoester de l'ergostane qui sont retrouvés exclusivement dans le genre *Petunia* (Solanaceae). Ex: pétuniastérone N (**93**) isolée de *Petunia hybrida*.[233]

**Pregnane orthoester :** ces produits, comme le composé **94**, possèdent tous une

230. Cui, J. et al. *Phytochemistry*, **2005**, *66* 2334–9.
231. Fan, C.-Q. et al. *Tetrahedron*, **2007**, *63* 6741–6747.
232. Capon, R. et al. *Aust. J. Chem.*, **1986**, *39* 1711–1715.
233. Elliger, C. A. et al. *J. Nat. Prod.*, **1989**, *52* 576–580.

chaine oligosaccharidique en C-3. Ils n'ont été retrouvés que chez *Dregea sinensis* (Asclepiadaceae).[234]

### 1.3.2 Activités biologiques des DDO

Les DDO présentent un grand nombre d'activités biologiques : antiviraux, cytotoxiques, agonistes des récepteurs TRPV1, pesticides, anti-hyperglycémiants, irritants ou encore promoteurs de tumeurs.[201] Parmi ces activités, leur interaction avec les récepteurs TRPV1, leur cytotoxicité et leurs propriétés anti-VIH sont les plus notables.

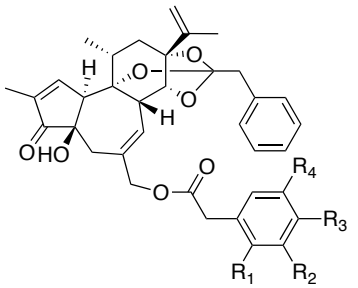
#### 1.3.2.1 Activation des récepteurs TRPV1

Les récepteurs TRPV1 (un acronyme anglais pour Transient Receptor Potential Vanilloid de classe 1) sont des récepteurs à canaux ioniques ($Ca^{2+}$) impliqués dans les mécanismes nociceptifs. Ils sont activés par des températures supérieures à 44 °C, des pH bas ou encore par des molécules de la famille des vanilloïdes présentant le motif vanillyle (**95**) comme la capsaïcine (**96**). Avec plus de 272 revues dans la dernière décennie, cette famille de récepteurs est sans doute une des cibles pharmacologiques les plus étudiées.[235]

La résinifératoxine (RTX) (**85**) est, quant à elle, le DDO le plus étudié du point de vue pharmacologique. Elle a été isolée en 1975 d'*Euphorbia resinifera*[226], une plante médicinale utilisée depuis plus de 2 000 ans pour le traitement des douleurs chroniques.[189,236] Avec des activités jusqu'à 100 000 fois supérieures à celle de la capsaïcine (**96**), la RTX (**85**) est qualifiée d'agoniste ultra-puissant des TRPV1.[237] Le développement, soit d'agonistes des récepteurs TRPV1, permettant d'atténuer les douleurs neuropathiques, soit d'antagonistes dans les cas de sur-expression de ces récepteurs découle directement des propriétés pharmacologiques que l'on prête aux dérivés de la résinifératoxine.

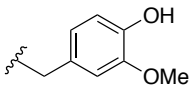
La RTX est un agent thérapeutique prometteur en tant qu'analgésique dans le traitement des douleurs associées aux polyneuropathies diabétiques et aux neuralgies postherpétiques. Plusieurs études cliniques ont été menées sur ce composé et la synthèse totale de la RTX en 1997, par l'équipe de Wender, aura permis de s'affranchir des problèmes de disponibilité de ce DDO et d'approfondir les études concernant son mode

234. Liu, Y. et al. *Steroids*, **2008**, *73* 184–92.
235. Szallasi, A. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011**, *11* 2116–2117.
236. Appendino, G. ; Szallasi, A. *Life Sci.*, **1997**, *60* 681–696.
237. Szallasi, A *Neuroscience*, **1989**, *30* 515–520.

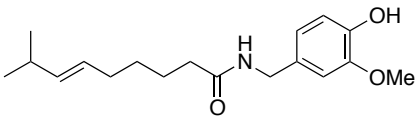



| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ |
|---|---|---|---|---|
| Resinifératoxine (RTX) | H | OMe | OH | H |
| 2-iodo-RTX | I | OMe | OH | H |
| 5-bromo,4-amino-RTX | H | OMe | $NH_2$ | Br |

RTX (**85**), 2-iodo-RTX (**97**) et 5-bromo,4-amino-RTX (**98**)




Motif vanillyle (**95**) commun des vanilloïdes




Capsaïcine (**96**)

d'action et les RSA.[238] Concernant les RSA, l'équipe de Wahl a montré que l'introduction d'un atome d'iode en *ortho* du méthoxy de la RTX induisait une inversion de l'activité pharmacologique, faisant de la 2-iodo-RTX (**97**) un *antagoniste* des récepteurs TRPV1.[239] Récemment, la 5-bromo-4-amino-RTX (**98**) s'est montrée être un antagoniste encore plus puissant.[240]

Globalement, la RTX et ses analogues peuvent être vus comme de puissants ligands des récepteurs vanilloïdes dont les effets bénéfiques et secondaires doivent cependant être mis en balance afin de déterminer leur véritable potentiel dans le traitement pharmacologique des douleurs neuropathiques.[235]

#### 1.3.2.2 Activité cytotoxique

La mézéréine (**83**), isolée dans les années 70 de *Daphne mezereum*,[224] a montré des activités *in vivo* très intéressantes sur des lignées leucémiques P388 et L1210 chez la souris à partir de $50\,\mu g\,mL^{-1}$.[241] Par la suite, de nombreux DDO ont montré des activités cytotoxiques envers plusieurs lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces évaluations biologiques a permis de dresser des RSA pour cette classe de composé que l'on schématise Fig. 130.[201]

Globalement, il apparait que la cytotoxicité des DDO s'exerce par deux principaux

238. Wender, P. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119* 12976–12977.
239. Wahl, P et al. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *59* 9–15.
240. Lim, K. S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21* 299–302.
241. Kupchan, S. ; Baxter, R. *Science*, **1975**, *187* 652.

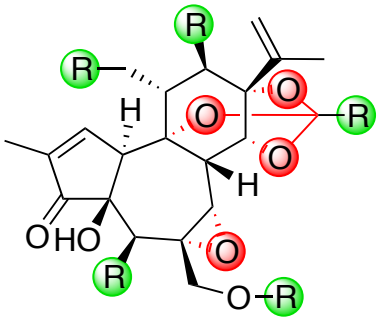


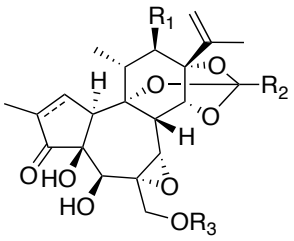

**Figure 130.** RSA des DDO comme agents cytotoxiques. En vert, les modifications structurales autorisées, en rouge, les modifications structurales conduisant à une perte d'activité.

mécanismes qui se complètent éventuellement. Certains DDO ont ainsi montré une excellente inhibition de l'ADN topoisomérase de type 1 comparable voire supérieure à celle de l'inhibiteur de référence, l'hydroxy-camptothécine (hCPT).[242] L'autre mécanisme impliquerait un arrêt en phase G1 des cellules visées, vraisemblablement lié à une activation des protéines kinases C (PKC).[243,244]

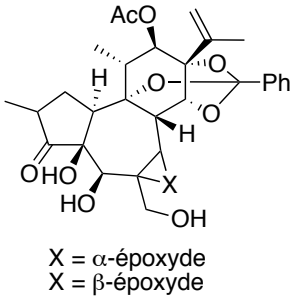
Les études concernant les activités biologiques et les RSA des DDO et des diterpènes de type daphnane de façon générale sont rendues difficiles par la présence limitée de ces métabolites au sein de la plante. Jusque récemment, le seul DDO ayant été synthétisé était la résinifératoxine (RTX) (**85**), en 1997, par l'équipe de Wender *et al.*.[238] En 2011, la même équipe a publié une stratégie de synthèse générale permettant l'accès au squelette DDO et à de nombreux analogues naturels ou synthétiques.[245] La yuanhuapine (**99**), précédemment isolée de *Daphne genkwa*,[227] ainsi que son stéréoisomère non-naturel (**100**) présentant l'époxyde en position $\beta$ ont ainsi été synthétisés.[245]

La synthèse de ces deux produits a déjà permis d'obtenir des résultats concernant leur activité biologique et l'importance de la stéréochimie de l'époxyde. (Tableau 11). La cytotoxicité précédemment mise en évidence de la yuanhuapine (**99**) vis-à-vis des lignées cancéreuses pulmonaires A549 a été confirmée.[246] D'autre part, une excellente affinité vis-à-vis de la PKC et la cytotoxicité vis-à-vis de lignées cellulaires leucémiques précédemment observées chez d'autres DDO ont également été détectées pour la yuan-

242. Zhang, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14* 3888–95.
243. Yoshida, M et al. *Int. J. Cancer*, **1996**, *66* 268–73.
244. Yoshida, M. et al. *Int. J. Cancer*, **2003**, *105* 601–6.
245. Wender, P. a. et al. *Nat. Chem.*, **2011**, *3* 615–619.
246. Hong, J.-Y. et al. *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, *58* 234–7.




DDO naturels accessibles par la voie de synthèse développée par Wender




Yuanhuapine ($\alpha$-époxyde) (**99**) et le stéréoisomère synthétique ($\beta$-époxyde) (**100**)

huapine (**99**).

Un premier élément des RSA vient confirmer l'importance de l'époxyde en 6,7 en insistant sur la nécessité d'une configuration en $\alpha$ de cet époxyde. En effet une perte d'activité avec une différence d'un facteur $> 1\,000$ est observée pour le stéréoisomère non-naturel de la yuanhuapine (**100**).

| **Composé** | **Affinité PKC, *Ki* (nM)** | **Cytotoxicité** | |
|---|---|---|---|
| | | A549 $EC_{50}$ (nM) | K562 $EC_{50}$ (nM) |
| (**99**) | 0,48 ± 0,07 | 150 ± 30 | 7 ± 1 |
| (**100**) | 346 ± 6 | > 10000 | > 10000 |

**Tableau 11.** Activités biologiques de la yuanhuapine (**99**) et de son stéréoisomère synthétique (**100**)[245]

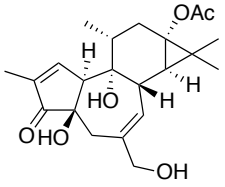
Certains DDO montrent des activités cytotoxiques puissantes. Celles-ci sont étroitement liées aux substituants portés par le squelette daphnane et à la configuration de celui-ci, mais le caractère minoritaire des métabolites de type DDO rend difficile l'étude biologique de ces composés. La nouvelle voie de synthèse élaborée par l'équipe de Wender permet l'accès à un grand nombre de DDO naturels et non-naturels, elle permettra sans aucun doute de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes d'action des DDO et éventuellement la découverte d'analogues synthétiques actifs.

#### 1.3.2.3 Activité antivirale

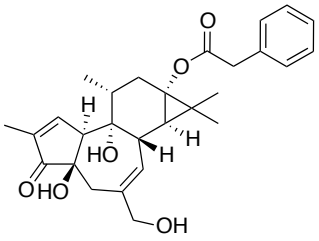
Plusieurs DDO ont montré des activités antivirales tout à fait intéressantes sur le VIH. Actuellement, le schéma thérapeutique classique du traitement d'une infection par le VIH est une trithérapie. L'administration simultanée d'un inhibiteur (nucléosidique

ou non) de la transcriptase inverse et d'un inhibiteur de la protéase voire d'inhibiteur de fusion, permet une réduction drastique de la réplication virale. Cependant, il n'y a pas de guérison à proprement parler et le VIH persiste de façon latente dans l'organisme. La purge de ces « réservoirs » de virus est donc une stratégie thérapeutique pertinente pour l'élimination du virus.

Dans les années 90, lors d'un programme de criblage visant la découverte d'agents anti-cancéreux et anti-viraux, le National Cancer Institute (NCI) s'intéresse à la pharmacopée traditionnelle des Iles Samoa. Parmi celle-ci, *Homalanthus nutans* (Euphorbiaceae) est une plante employée en médecine traditionnelle pour le traitement de la fièvre jaune. Une forte activité anti-VIH est détectée sur l'extrait brut des tiges. L'étude phytochimique conduira à l'identification du 12-deoxyphorbol-13-acétate (prostratine) (**101**), un diterpène de la famille des tiglianes comme la molécule responsable de cette activité.[247]




Prostratine (**101**)



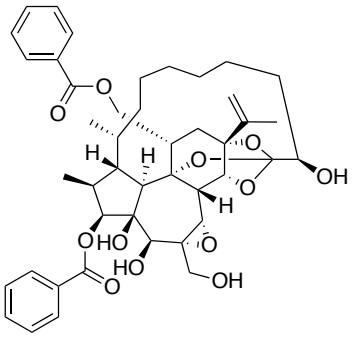

DPP (**102**)

L'activité antivirale de la prostratine (**101**) a suscité beaucoup d'intérêt et a été largement étudiée par la suite. Cet ester de phorbol, inhibe l'infection par le VIH tout en activant sa réplication dans les réservoirs de latence.[248] Cette molécule a donc été proposée comme candidat en vue de réaliser des études précliniques.[248,249] Le mécanisme d'action antiviral de la prostratine implique l'activation de la protéine Kinase C (PKC).[250,251] D'autres diterpènes au squelette carboné similaire, comme le 12-deoxyphorbol-13-phénylacétate (DPP) (**102**) ou des dérivés de l'ingénol ont également montré de puissantes activités anti-VIH.[252,253]

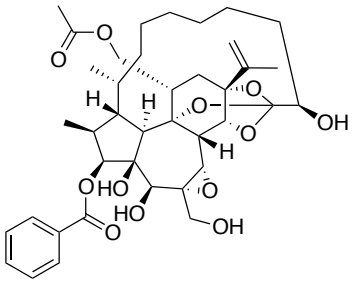
247. Gustafson, K. R. et al. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35* 1978–86.
248. Kulkosky, J. *Blood*, **2001**, *98* 3006–3015.
249. Wender, P. a. et al. *Science*, **2008**, *320* 649–52.
250. Williams, S. a. et al. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279* 42008–17.
251. Hezareh, M. et al. *Antiviral chem. chemoth.*, **2004**, *15* 207–22.
252. Fujiwara, M et al. *Antimicrob. Agents. Ch.*, **1996**, *40* 271–3.
253. Bocklandt, S et al. *Antivir. Res.*, **2003**, *59* 89–98.

Comme nous l'avons brièvement évoqué page 129, des daphnanes de type DDO isolés de *Trigonostemon thyrsoideum*, les trigonothyrines C et F (**79** et **73**) ont présenté des activités de l'ordre du micromolaire vis-à-vis du VIH.

En 2011, Asada et al. isolent une série de DDO de *Stellera chamaejasme* (Thymelaeaceae), les stelleralides A (**103**) B et C, ainsi que cinq DDO connus, dont la gnidimacrine (**84**). Ces composés montrent des activités anti-VIH subnanomolaires à des concentrations non-cytotoxiques.[254]



Gnidimacrine (**84**)



Stelleralide A (**103**)

La même équipe a récemment entrepris l'étude du mécanisme de l'activité antivirale de la gnidimacrine.[255] Cette molécule exerce son activité antivirale à plusieurs niveaux :

- en inhibant l'infection par le VIH via une diminution des récepteurs CCR5 et CD4 (récepteurs cellulaires du virus) médiée par l'activation de la PKC
- en activant la réplication du virus dans les réservoirs de latence
- par toxicité spécifique des cellules infectées de façon latente

L'ensemble de ces activités s'exercent à des concentrations $< 10$ pM. Cette molécule, globalement 1 000 fois plus active que la prostratine, témoigne des puissantes propriétés antivirales de certains DDO.

254. Asada, Y. et al. *Org. Lett.*, **2011**, *13* 2904–2907.
255. Huang, L. et al. *PLoS ONE*, **2011**, *6* e26677.

## 1.4 Les composés organohalogénés

### 1.4.1 Importance et occurrence naturelle

A l'heure actuelle, plus de 4500 composés organohalogénés produits par des organismes vivants ont été isolés. Les plantes, les champignons, les bactéries, les insectes, les invertébrés marins et certains animaux y compris les humains produisent des métabolites secondaires halogénés. Les composés organohalogénés sont retrouvés principalement chez les organismes marins (macro et microorganismes), ils sont plus rarement isolés des végétaux supérieurs.

Les classes structurales retrouvées chez les composés halogénés sont variées et vont des composés phénoliques et aliphatiques simples aux polycétides, alcaloïdes et oligopeptides complexes. Le plus souvent, ce sont les composés chlorés que l'on rencontre, suivis des composés bromés. Les composés iodés et fluorés sont beaucoup plus rares dans la nature.

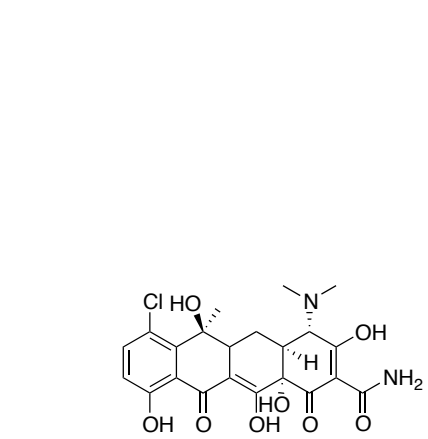
### 1.4.2 Intérêts et fonctions biologiques

De nombreux métabolites halogénés présentent des activités biologiques remarquables.

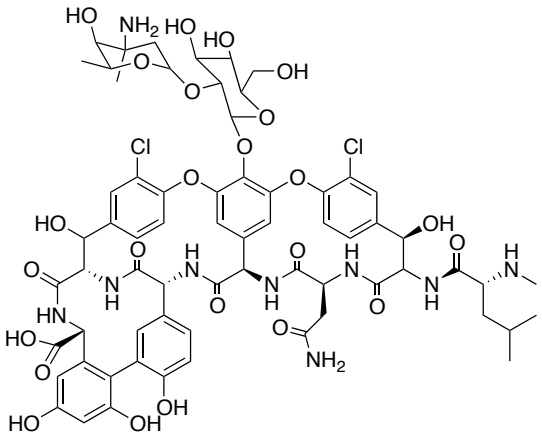
On donnera l'exemple de la vancomycine (**104**). Isolée de *Streptomyces orientalis*,[256] cet antibiotique de type glycopeptidique cible les bactéries Gram + en inhibant la synthèse du peptidoglycane. L'atome de chlore présent sur la vancomycine (**104**) est absolument nécessaire à l'activité du composé puisque en remplaçant celui-ci par un atome d'hydrogène on observe une perte de 70 % de l'activité biologique.[257] La chlortétracycline (**105**) est le premier antibiotique de la classe des tétracyclines. Elle a été isolé de *Streptomyces aureofasciens*.[258]

La calichéamicine $\gamma_1^I$ (**106**) est un métabolite secondaire iodé, de structure complexe, isolé de *Micromonospora echinospora*.[259] Son mécanisme d'action fascinant implique l'abstraction de deux atomes d'hydrogène provenant de l'ADN lors d'une cyclisation de Bergman de la fonctionnalité ene-diyne de la calichéamicine conduisant à une scission de l'ADN. La forte cytotoxicité de cette molécule empêche son emploi seule. Aujourd'hui,

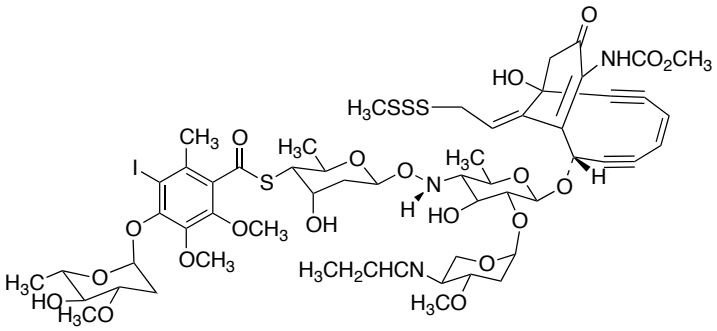
256. Moellering, R. C. *Clin. Infect. Dis.*, **2006**, *42* S3–4.
257. Harris, C. M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107* 6652–6658.
258. Salamon, S. M. *Survey of Ophthalmology*, **1985**, *29* 265–75.
259. Lee, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109* 3464–3466.



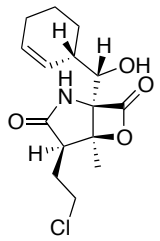
Chlortétracycline (**105**)



Vancomycine (**104**)



Calichéamicine $\gamma_1^I$ (**106**)



Salinosporamide A (**107**)

**Figure 137.** Composés organohalogénés bioactifs

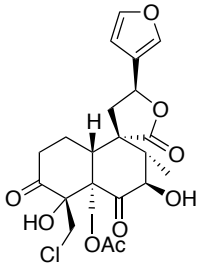
plusieurs hybrides calichéamicine-anticorps permettant de cibler les cellules cancéreuses sont en phase d'évaluation clinique.[260]

La salinosporamide A (**107**) est un puissant inhibiteur du protéasome. Cette petite molécule halogénée composée de cycles $\gamma$-lactame et $\beta$-lactone accolés a été isolée en 2003 d'une bactérie marine, *Salinospora tropica*.[261] La forte cytotoxicité et la spécificité de la salinosporamide A (**107**) a conduit à l'entrée de celle-ci en évaluation clinique moins de trois ans après sa découverte.[262]

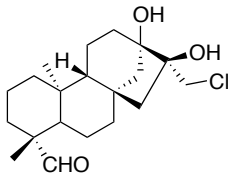
260. Ellestad, G. *Chirality*, **2011**, *671* 660–671.
261. Feling, R. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42* 355–357.
262. Fenical, W. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17* 2175–2180.

### 1.4.3 Diterpènes halogénés chez les végétaux supérieurs

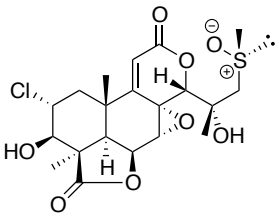
L'objectif de cette section n'est pas de dresser un inventaire des composés organohalogénés - l'excellent ouvrage de Gordon W. Gribble « *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update* »[263] permet d'avoir une vue d'ensemble de la diversité structurale et l'origine de ces composés - ici, nous donnerons quelques exemples de diterpènes halogénés isolés de végétaux supérieurs, les molécules isolées de *Trigonostemon cherrieri* appartenant a cette classe.



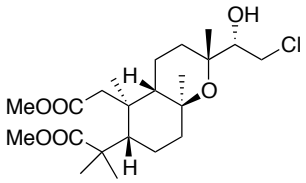

Teuracémine (**108**)




(**109**)




Rakanmakilactone E (**110**)




Excoecarine F (**111**)

**Figure 138.** Diterpènes halogénés d'origine terrestre

La teuracémine (**108**) est un diterpène de type *néo*-clérodane isolé de *Teucrium racemosum* (Labiateae). La teuracémine est une chlorohydrine et elle a été isolée avec l'époxide correspondant. La détection du composé chloré dans l'extrait brut acétone indique cependant la nature non-artéfactuelle de la teuracémine.[264]

*Bruguiera gymnorrhiza* (Rhizophoraceae) est une plante de mangrove. L'étude phytochimique des tiges a conduit à l'isolement de diterpènes de type *ent*-kaurane chlorés comme le composé **109**.[265]

263. Gribble, G. W., *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*, First edit ; Springer : 2010, p. 613.
264. Bruno, M. et al. *Phytochemistry*, **1995**, *40* 505–507.
265. Han, L. et al. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67* 1620–3.

Un métabolite chloré et soufré, la rakanmakilactone E (**110**), a été isolé des feuilles de *Podocarpus macrophyllus* var. *maki* (Podocarpaceae).[266]

La résine du bois d'*Excoecaria agallocha* renferme plusieurs diterpènes chlorés de type labdane, ici, l'excoecarine F (**111**).[267] Il est intéressant de noter qu'*Excoecaria agallocha* appartient à la famille des Euphorbiaceae et que cette plante contient également des diterpènes daphnanes orthoester comme l'excoecariatoxine ainsi que des esters de phorbols aux propriétés antivirales (HIV).[222,268]

Comme les quatre diterpènes précédents, l'ensemble des diterpènes d'origine terrestre halogénés isolés jusqu'à présent sont des chlorohydrines.

### 1.4.4 Biosynthèse des composés halogénés

Comme on l'a vu précédemment, plusieurs composés halogénés montrent des propriétés biologiques intéressantes. En chimie médicinale, l'incorporation d'halogène sur un composé en processus d'optimisation est une stratégie fréquente permettant de moduler les activités biologiques et des caractéristiques telles que la biodisponibilité des molécules. Or au laboratoire, les halogénations requièrent souvent des conditions dures, elles sont peu régio et stéréosélectives, et conduisent souvent à la formation de composés secondaires indésirables. Autant de raisons de s'intéresser à la biosynthèse des composés organohalogénés naturels.

La Nature présente en effet plusieurs enzymes capables de mener des halogénations de façon spécifique sur une grande variété de squelettes organiques. L'étude de ces enzymes est donc particulièrement intéressante pour la compréhension des mécanismes de biosynthèse des composé halogénés, de plus, ces enzymes présentent un potentiel biotechnologique important.

Les premières chloroperoxydases hème-dépendantes ont été identifiées en 1966. Depuis, l'étude de nouvelles halogénases a permis l'identification de trois autres cofacteurs redox : le vanadium, la $FADH_2$ (la forme réduite de la flavine-adénine dinucléotide) et un centre constitué de $Fe^{2+}$ non-hèmique lié à deux résidus histidine. Voir figure 139. Ces quatre cofacteurs rédox peuvent être groupés en deux catégories en fonction de la nature de leur co-substrat oxydant.

266. Park, H *Tetrahedron*, **2004**, *60* 171–177.
267. Konishi, T. et al. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, *47* 456–458.
268. Erickson, K. et al. *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58* 769–772.

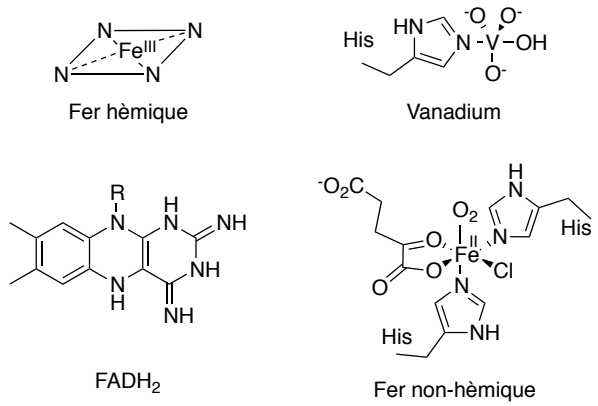



**Figure 139.** Cofacteurs rédox des halogénases connues

• Les enzymes hème et vanadium-dépendantes utilisent le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ comme co-substrat. On les qualifie d'haloperoxydases.

• Les enzymes flavine-dépendantes et $Fe^{2+}$ non-hèmique-dépendantes utilisent le dioxygène $O_2$ comme cosubstrat. On dit que ce sont des halogénases $O_2$-dépendantes.

Enfin, des halogénases nucléophiles utilisant la S-Adénosyl Methionine (SAM) comme cofacteur et permettant l'incorporation de fluor $F^-$ chez *Streptomyces cattleya* et de $Cl^-$ chez *Salinospora tropica* ont été caractérisées.[269,270]

Le tableau 12 résume les caractéristiques de ces cinq systèmes enzymatiques catalysant des halogénations.

| **Type d'enzyme** | **Co-facteurs et co-substrats** | **Forme de l'halogène activé** | **Exigences du substrat** |
|---|---|---|---|
| Fe hémique-dépendantes | Hème $H_2O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Vanadium-dépendantes | vanadium, $H_2O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Flavine-dépendante | FADH2, $O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Fe non-hémique-dépendantes | Fe(II), $O_2$, $\alpha$-cetoglutarate | X• | aliphatique, non-activé |
| Halogénases nucléophiles | | $X^-$ | électrophile, bon groupement partant |

**Tableau 12.** Systèmes enzymatiques catalysant des halogénations et leurs caractéristiques

269. Dong, C. et al. *Nature*, **2004**, *427* 561–565.
270. Eustáquio, A. S. et al. *Nat. Chem. Biol.*, **2008**, *4* 69–74.

Ces dernières années, la compréhension des mécanismes de biohalogénation a beaucoup progressé. Plusieurs groupes d'enzymes capables de mener des halogénations sur des substrats spécifiques (indoles, phénols, groupement aliphatiques etc.) en employant des mécanismes réactionnels particuliers ont été caractérisés.

Certaines de ces enzymes trouvent déjà des applications biotechnologiques fort intéressantes. Ainsi la fluorinase de *Streptomyces cattleya* permet l'incorporation de fluor marqué $^{18}$F à des molécules employées en tomographie à émission de positrons (TEP).[271] On notera également le travail remarquable de l'équipe de Sarah O'Connor qui a conduit à la production d'alcaloïdes monoterpéniques indoliques chlorés non-naturels par la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), après avoir introduit dans la plante des halogénases flavine-dépendantes d'origine bactérienne.[272]

Les investigations concernant le potentiel biotechnologique de ces enzymes n'en sont qu'à leur début mais promettent, à l'avenir, d'intéressantes découvertes.

271. Deng, H. et al. *Chem. Commun.*, **2006** 652–4.
272. Runguphan, W. et al. *Nature*, **2010**, *468* 461–464.

# Chapitre 2

# Travaux personnels

**Plan**


2.1 Étude phytochimique de *Trigonostemon cherrieri* . . . . . **149**
2.1.1 Récolte et identification . . . . . 150
2.1.2 Résultats préliminaires . . . . . 150
2.1.3 Extraction et purification d'une série de DDO halogénés . . 151
2.1.4 Caractérisation des composés isolés . . . . . 162
2.1.5 Configuration absolue de la trigocherrine A . . . . . 199
2.2 Hypothèse biogénétique de formation des DDO halogénés de *Trigonostemon cherrieri* . . . . . **202**
2.3 Activités biologiques . . . . . **208**
2.3.1 Activité biologique sur le virus de la dengue . . . . . 208
2.3.2 Activité biologique sur le virus du chikungunya . . . . . 208


## 2.1 Étude phytochimique de *Trigonostemon cherrieri*

La sélection de *Trigonostemon cherrieri* pour son étude chimique a été faite en se basant sur plusieurs critères :

• **activité biologique :** lors du criblage mené sur 1350 extraits provenant de 650 plantes néo-calédoniennes, l'extrait AcOEt filtré sur polyamide des écorces de *Trigonostemon cherrieri* a montré 85 % d'inhibition à $50\,\mu g\,mL^{-1}$ de l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5 du virus de la dengue. L'activité de l'extrait a été confirmée avec 76 % d'inhibition à $10\,\mu g\,mL^{-1}$. L'extrait AcOEt ne présente pas de cytotoxicité sur cellules KB et MRC5 à $1\,\mu g\,mL^{-1}$.

• **critères chimiotaxonomiques :** l'étude bibliographique du genre *Trigonostemon* permet de constater la présence récurrente de DDO aux structures complexes et certains de ces métabolites ont montré des activités antivirales importantes sur HIV (Voir section 1.2.3 Composition chimique du genre *Trigonostemon*, page 123). D'autre part, *Trigonostemon* est un genre monospécifique en Nouvelle-Calédonie.[196]

C'est donc sur des critères biologiques, provenant du criblage d'extraits bruts de plantes de Nouvelle-Calédonie, ainsi que pour l'intérêt chimiotaxonomique du genre que nous avons sélectionné *Trigonostemon cherrieri* pour cette étude.

### 2.1.1 Récolte et identification

*Trigonostemon cherrieri* a été récolté une première fois en Juin 1999 par Marc Litaudon, code de récolte : LIT-0867. Par la suite, en Mai 2009, une seconde récolte (POU-0324) a été effectuée par Cyril Poullain afin d'obtenir une quantité plus importante de matériel végétal. Les deux récoltes ont eu lieu au même endroit, dans la région de Poya sur la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie. (Voir carte, page 119) La récolte a été effectuée au sein de la propriété privée de M. et C. Metzdorf, éleveurs à Poya, que nous remercions pour avoir gracieusement permis l'accès à leur domaine. L'espèce a été identifiée par Marc Litaudon (LIT-0867) et Cyril Poullain (POU-0324) selon les critères botaniques décrits section 1.2.1.2. Un échantillon (LIT-0867) a été déposé à l'herbier du Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Appliquées du Centre IRD de Nouméa. Lors des deux récoltes, les chercheurs se sont attachés à ne prélever que des branches secondaires évitant ainsi l'endommagement définitif des spécimens récoltés.

### 2.1.2 Résultats préliminaires

L'extrait AcOEt des écorces de tronc de *Trigonostemon cherrieri* a été fractionné dans notre équipe suivant une méthode standardisée décrite section 2.1.2. Le chromatogramme suivant est obtenu (superposition des chromatogrammes UV à 250 (noir) et 205 (bleu) nm et du chromatogramme ELSD (rose)). (Fig. 140) Au vu des activités biologiques observées, on ne peut pas définir de fraction clairement porteuse de l'activité de l'extrait brut qui est de 76 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$.

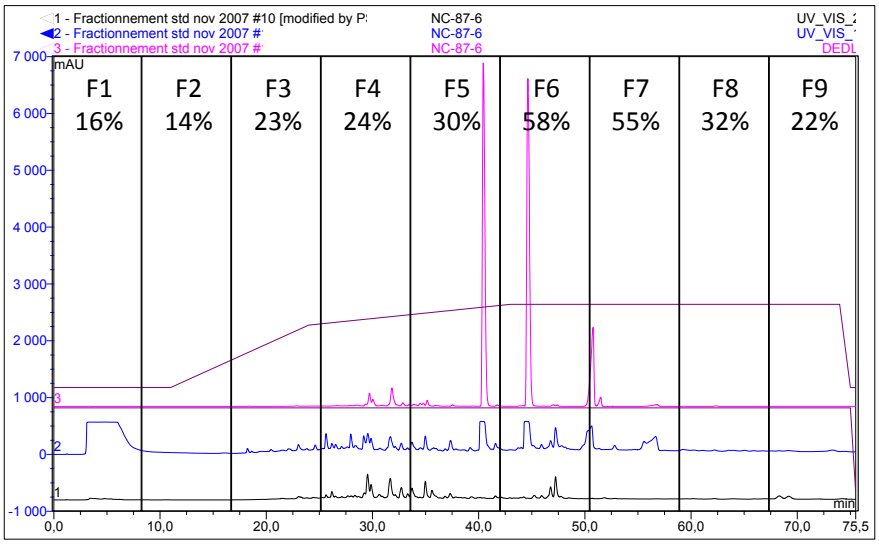



**Figure 140. Fractionnement standard des écorces de *Trigonostemon cherrieri*** - activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV exprimée en pourcentage d'inhibition à 10 µg mL$^{-1}$

### 2.1.3 Extraction et purification d'une série de DDO halogénés

Dans un premier temps, 1,2 kg d'écorces séchées de *Trigonostemon cherrieri* (récolte POU-0324) ont été extraits par l'acétate d'éthyle puis par le méthanol conduisant à 23 g ($\rho$= 1,9 % p/p) et XX g ($\rho$= X,X % p/p) d'extraits, respectivement.

Le chromatogramme de l'extrait brut AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* (visible sur les figures 140 et 141) montre la richesse de l'extrait. Après avoir procédé à une partition *n*-hexanes/MeOH$_{(aq)}$ de l'extrait AcOEt, la fraction polaire est soumise à une séparation sur phase inverse par chromatographie Flash conduisant à 20 fractions. L'évaluation biologique de ces fractions sur la NS5 polymérase du DENV nous guide vers la sélection des fractions F11 à F15 (de 82 à 95 % d'inhibition à 10 µg mL$^{-1}$). Le spectre $^1$H de la fraction F11 indique la présence majoritaire de composés aliphatiques (signaux intenses entre $\delta$ 1,20 et 1,40) et révèle la présence d'un mélange complexe de composés minoritaires présentant des signaux répartis entre 0,5 et 8,5 ppm. La fraction F11 est séparée par CLHP préparative pour obtenir 18 fractions. La RMN du $^1$H de chaque fraction est effectuée. Le spectre $^1$H de la fraction F$^{11}$18 (5,7 mg) semble indiquer la présence de composés dont les signaux correspondent aux minoritaires observés sur le spectre proton de la fraction F11. La séparation de la fraction F$^{11}$18 sur colonne

analytique permet l'isolement de 1,5 mg de la trigocherrine A (**112**). L'élucidation structurale de ce composé nous conduit à proposer une structure de type DDO halogéné. Le spectre $^{1}$H est caractérisé par la présence de nombreux singulets entre 3 et 6 ppm. La présence d'atomes de chlore sur la molécule est indiquée par des massifs isotopiques caractéristiques [M+2] sur le spectre de masse.

Par la suite, la spectrométrie RMN $^{1}$H et la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) nous ont permis de rechercher ces deux caractéristiques spectrales (singulets sur le spectre $^{1}$H et massifs isotopiques [M+2]) et ont guidé le fractionnement des extraits de *Trigonostemon cherrieri* jusqu'à l'obtention d'une série de DDO halogénés. Le principe de ce fractionnement *RMN et CLHP-MS guidé* est illustré Fig. 141.

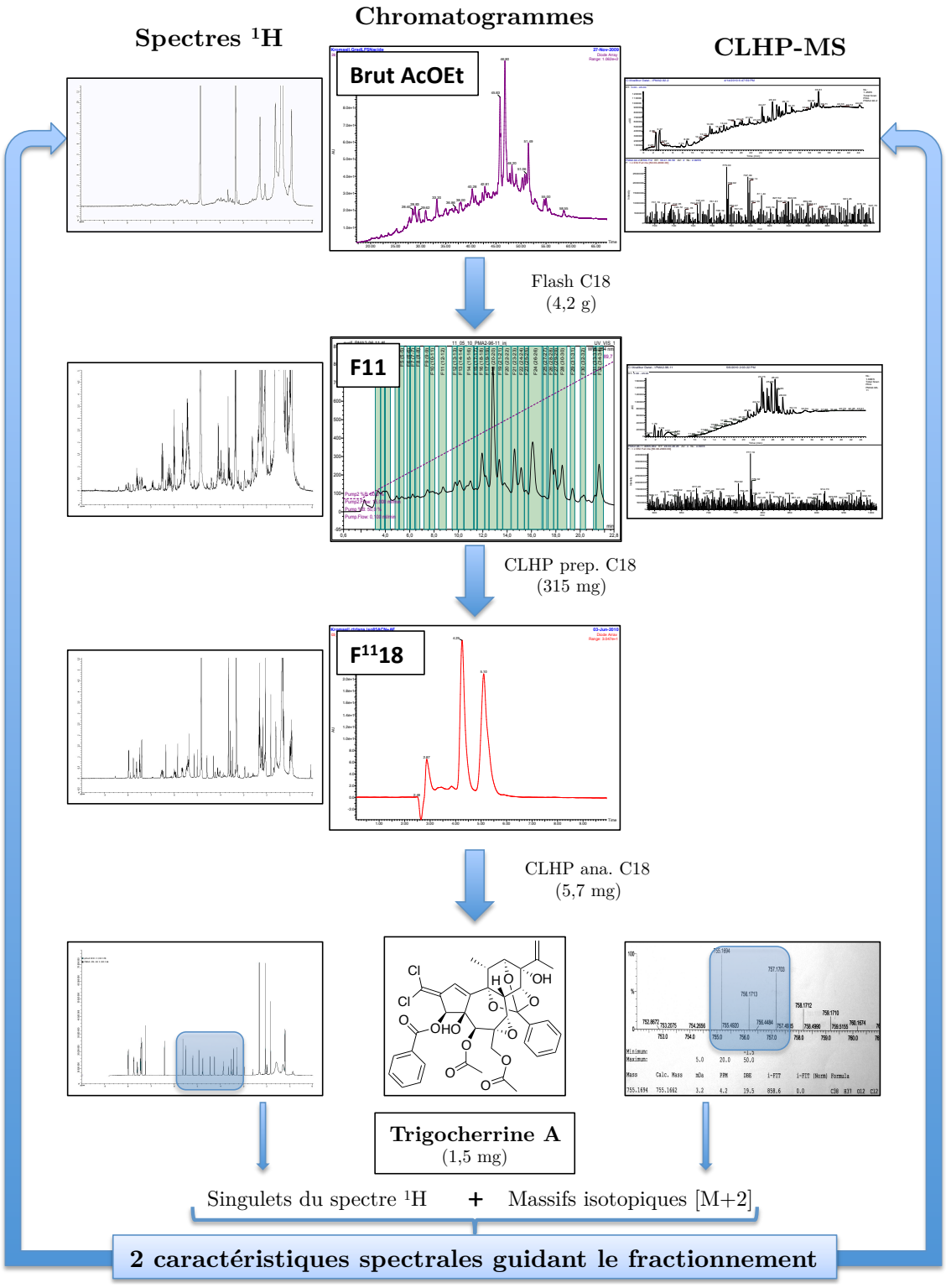



**Figure 141.** Schéma du principe du fractionnement RMN et CLHP-MS guidé

**Figure 142.** Lichens sur le tronc de *T. cherrieri*

Ensemble, le fait que ces composés soit chlorés, que des produits au squelette analogue mais non-halogénés aient été isolés du genre *Trigonostemon* précédemment, et l'observation de lichens présents sur l'écorce du tronc de *Trigonostemon cherrieri* (Fig. 142) nous ont fait supposer que l'halogénation pouvait éventuellement être effectuée par des lichens sur des métabolites biosynthétisés par la plante. Afin de vérifier cette hypothèse, l'investigation phytochimique du bois de cœur, vraisemblablement exempt de lichens, a donc été entreprise. Six composés, dont trois précédemment isolés dans l'écorce ont été caractérisés. Tous les dérivés isolés sont halogénés, infirmant ainsi l'hypothèse initiale d'une halogénation secondaire par des lichens présents sur l'écorce du tronc.

Au total 10 DDO halogénés ont été isolés de *Trigonostemon cherrieri*. Tous ont été obtenus en très faibles quantités. (Tableau 13) Certains ont montré une bonne activité antivirale sur le virus de la dengue (DENV) et du chikungunya (CHIKV).

#### 2.1.3.1 Extrait d'écorces

L'extrait AcOEt (23 g) des écorces de *T. cherrieri* a été soumis à une partition liquide/liquide avec comme système *n*-hexanes/$MeOH_{(aq)}$ conduisant à l'obtention d'une fraction apolaire (14,9 g) et d'une fraction polaire (8 g). La moitié de l'extrait polaire (4,2 g) a été soumis à une chromatographie Flash $C_{18}$ en suivant un gradient $H_2O$:MeOH + 0,1 % d'acide formique (AF) conduisant ainsi à 20 fractions notées F1 à F20. Au vu des profils RMN $^1H$ et LC-MS, des pourcentages d'inhibition observées vis-à-vis de la NS5 polymérase du DENV et des quantités disponibles, les fractions F11, F13, F14 et F15 sont travaillées. L'injection de la fraction F11 en CLHP préparative conduit à 18 fractions, $F^{11}1$ à $F^{11}18$. La purification de la dernière fraction par CLHP analytique (collecte manuelle) conduit à l'isolement de la trigocherrine A (**112**). La fraction F13, soumise a une chromatographie Flash en phase $C_{18}$, conduit à 24 fractions notées $F^{13}1$ à $F^{13}24$. La purification de fractions $F^{13}13$, $F^{13}14$ et $F^{13}21$ par CLHP semi-préparative permet le ré-isolement de la trigocherrine A (**112**) et l'isolement de la trigocherrine B

(**113**) et du trigocherriolide A (**118**). Le travail de la fraction $F^{13}19$ par CLHP semi-préparative et analytique successives conduit à l'isolement de la trigocherrine C (**114**) et du trigocherriolide B (**119**). Les fractions F14 et F15 sont rassemblées au vu de leurs profils similaires en RMN $^1$H et LC-MS. Elles sont soumises à une chromatographie Flash $C_{18}$ conduisant à 29 fractions notées $F^{14/15}1$ à $F^{14/15}29$. Après dégraissage à l'hexane, les CLHP semi-préparative et analytique successives de la fraction $F^{14/15}18$ conduisent à l'isolement du trigocherriolide C (**120**) et D(**121**) et au ré-isolement du trigocherriolide A (**118**).

Les schémas 143 et 144 permettent de visualiser les étapes successives de purification conduisant à l'isolement des trigocherrines et des trigocherriolides de l'écorce de *Trigonostemon cherrieri*. Les conditions expérimentales sont détaillées dans la partie expérimentale, page 232.

#### 2.1.3.2 Extrait de bois de cœur

Deux extractions AcOEt sont réalisées. Une première extraction fut réalisée par Cyril Poullain en Nouvelle-Calédonie sur environ 200 g de bois sec. Une seconde extraction, sur 700 g de bois sec, est réalisée au Zippertex (100 bars, 40 °C), à l'unité pilote de l'ICSN. Après comparaison (CCM, RMN $^1$H et LC-MS), les deux extraits sont combinés (6,4 g) puis soumis à une chromatographie Flash $C_{18}$ pour conduire à 32 fractions notées F'1 à F'32. Les purifications de la fraction F'20 par CLHP préparative et semi-préparative successives a conduit au ré-isolement de la trigocherrine A (**112**). La fraction F'22 est chromatographiée sur colonne de $C_{18}$ en Flash puis CLHP semi-préparative pour ré-isoler la trigocherrine B (**113**). Enfin, les CLHP préparative, semi-préparative et analytique successives menées sur la fraction F'24 permettent l'obtention des trigocherrines D (**115**), E (**116**), et F (**117**) ainsi que le ré-isolement de la trigocherrine B (**113**) et du trigocherriolide B (**119**).

Le schéma 145 permet de visualiser les étapes successives de purification conduisant à l'isolement des trigocherrines et du trigocherriolide du bois de *Trigonostemon cherrieri*. Les conditions expérimentales sont détaillées dans la partie expérimentale.

#### 2.1.3.3 Bilan des deux extractions

Les travaux phytochimiques entrepris sur les extraits AcOEt d'écorces de tronc et de bois de *Trigonostemon cherrieri* ont permis d'isoler 10 produits nouveaux appartenant

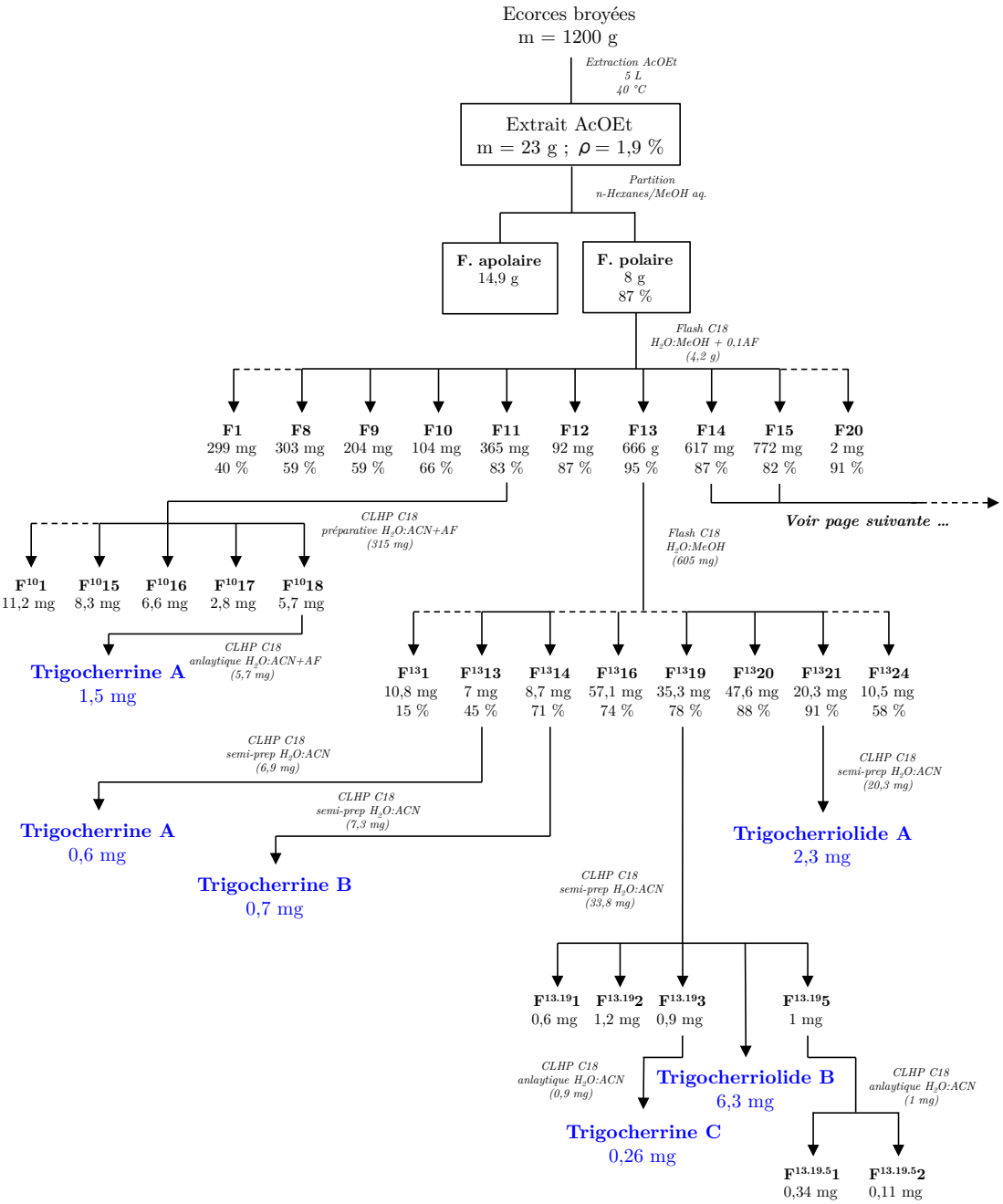



**Figure 143.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie I - *activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à* $10\,\mu g\,mL^{-1}$*) et du CHIKV (*$EC_{50}$ *en* µM*)*

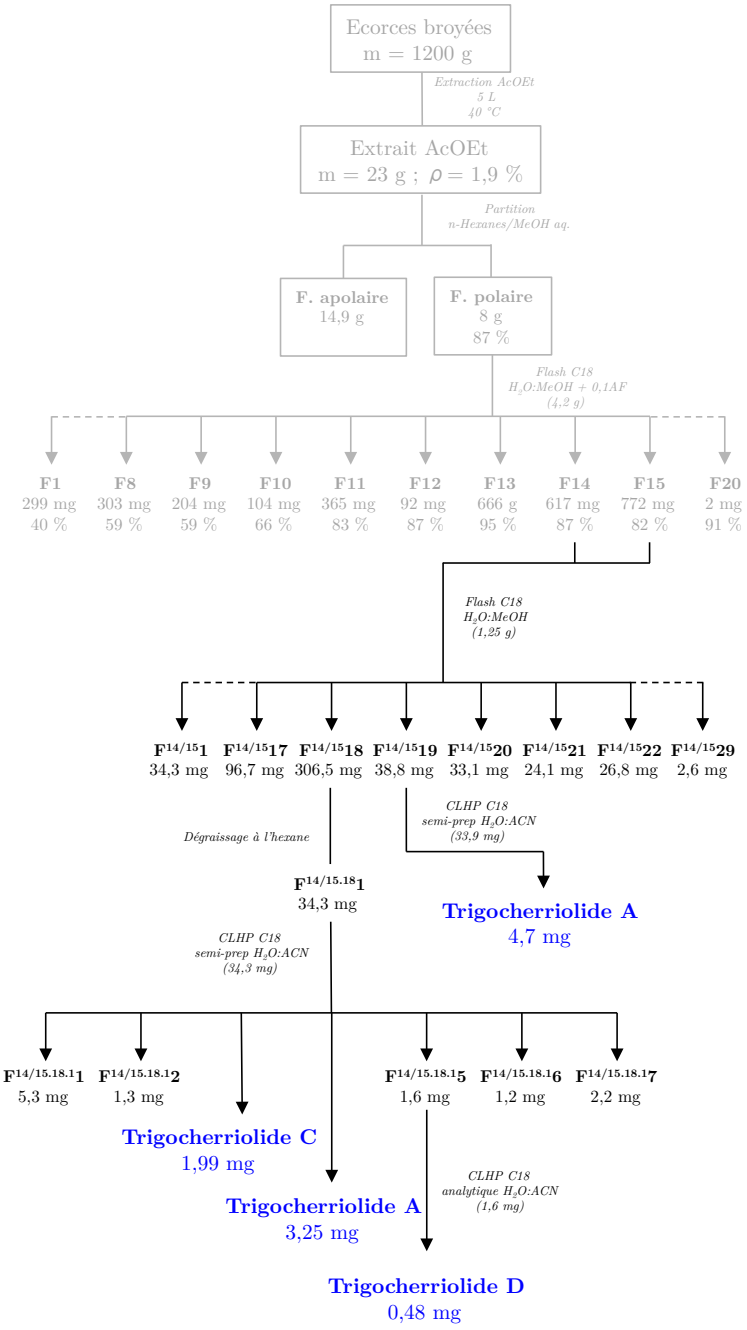



**Figure 144.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie II

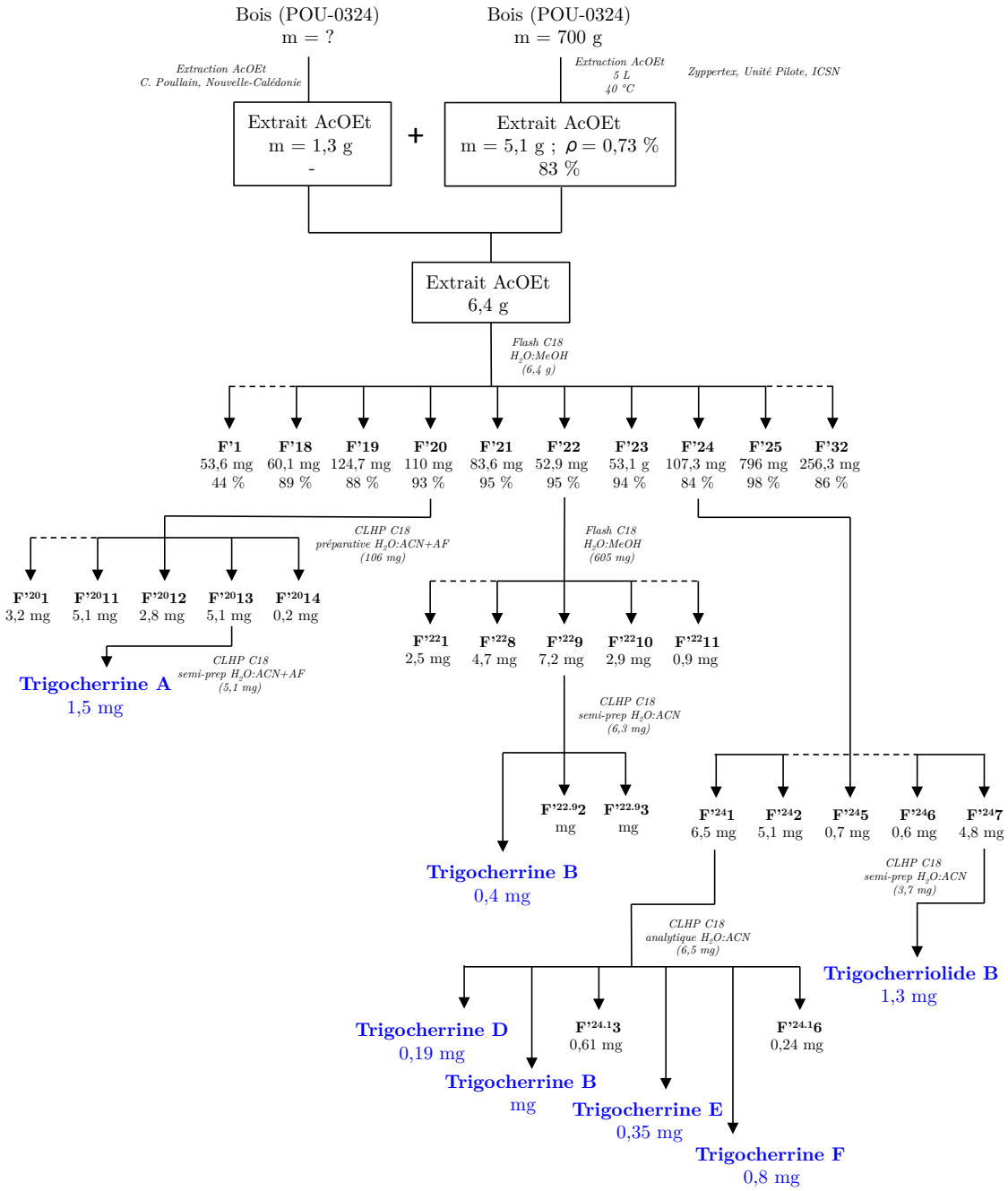



**Figure 145.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt du bois de cœur *Trigonostemon cherrieri - activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à* $10\,\mu g\,mL^{-1}$*) et du CHIKV (*$EC_{50}$ *en* µM*)*

à une même série chimique : les daphnanes diterpènes orthoesters (DDO) halogénés. En référence au nom de l'espèce, nous avons nommé ces produits « trigocherrine » pour les dérivés simples et « trigocherriolide » pour les dérivés possédant un macrocycle lactonique.

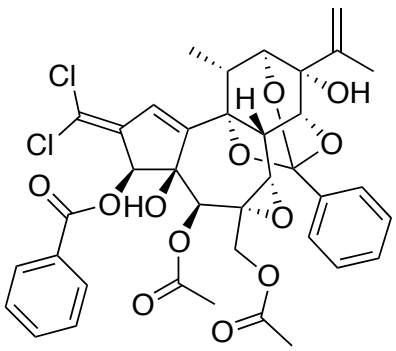
Les diterpènes des Euphorbiaceae et particulièrement les daphnanes, sont connus pour être présents sous forme de mélanges complexes et en faibles quantités au sein de la plante.[273] Effectivement, de nombreuses purifications successives ont été nécessaires pour isoler quelques miligrammes ou parfois quelques centaines de microgrammes des composés d'intérêt. Les échantillons purs ont été pesés sur une balance de haute précision (± 0,01 mg). Les rendements globaux sont rapportés dans le tableau 13.

**Tableau 13.** Rendements d'extraction des composés isolés de *Trigonostemon cherrieri*

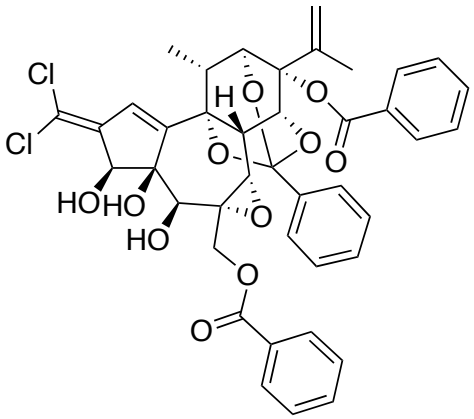
| **Composé** | **Nom** | **Masse (mg)** | **Rendement (% p/p)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Ecorces | Bois |
| (**112**) | Trigocherrine A | 3,6 | $3{,}8.10^{-4}$ | $1{,}8.10^{-4}$ |
| (**113**) | Trigocherrine B | 1,1 | $1{,}4.10^{-4}$ | $5{,}4.10^{-5}$ |
| (**114**) | Trigocherrine C | 0,26 | $5.10^{-5}$ | $2{,}3.10^{-5}$ |
| (**115**) | Trigocherrine D | 0,19 | - | |
| (**116**) | Trigocherrine E | 0,35 | - | $4{,}3.10^{-5}$ |
| (**117**) | Trigocherrine F | 0,8 | - | $9{,}8.10^{-5}$ |
| (**118**) | Trigocherriolide A | 10,25 | $3{,}1.10^{-3}$ | $2{,}1.10^{-4}$ |
| (**119**) | Trigocherriolide B | 7,6 | | $1{,}1.10^{-3}$ |
| (**120**) | Trigocherriolide C | 1,99 | $1{,}1.10^{-3}$ | |
| (**121**) | Trigocherriolide D | 0,48 | $2{,}6.10^{-4}$ | |

273. Devappa, R. K. et al. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **2010**, *88* 301–322.

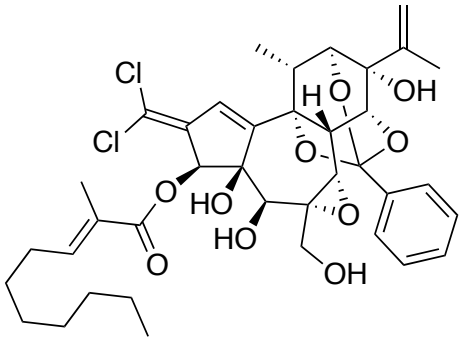
# Trigocherrines isolées des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*



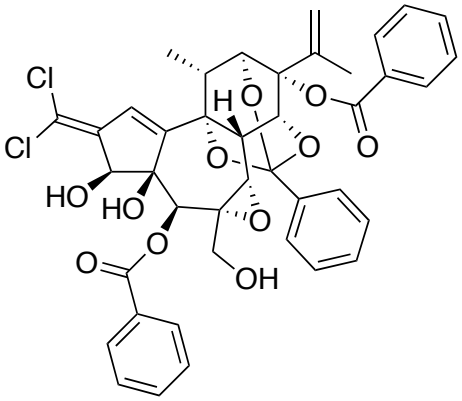
Trigocherrine A (**112**)



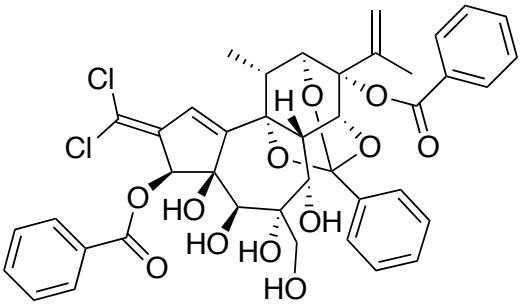
Trigocherrine B (**113**)



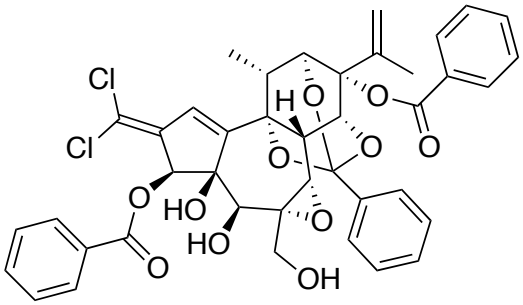
Trigocherrine C (**114**)



Trigocherrine D (**115**)

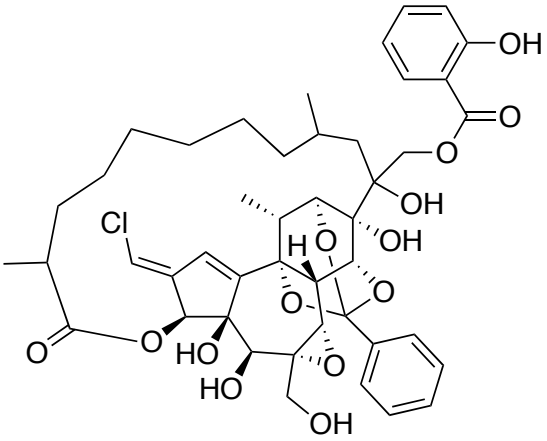


Trigocherrine E (**116**)

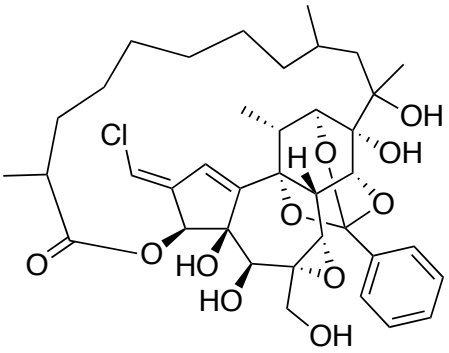


Trigocherrine F (**117**)

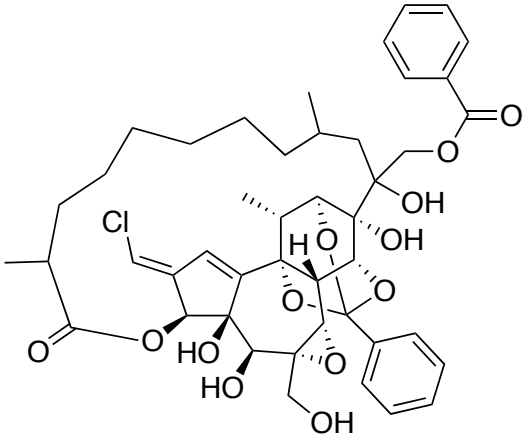
# Trigocherriolides isolées des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*



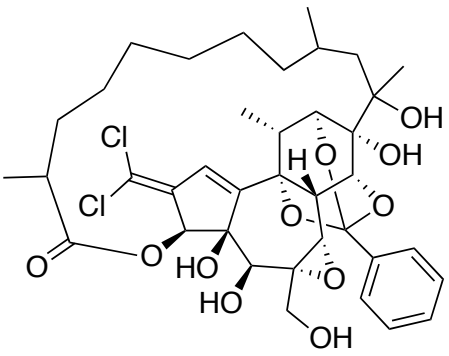

Trigocherriolide A (**118**)




Trigocherriolide B (**119**)




Trigocherriolide C (**120**)




Trigocherriolide D (**121**)

### 2.1.4 Caractérisation des composés isolés

Les composés (**112-121**) isolés des écorces de *Trigonostemon cherrieri* ont été caractérisés par l'analyse des données spectroscopiques de RMN (1D et 2D) et de masse. Il faut souligner que la possibilité d'employer la nouvelle microsonde équipant le spectromètre RMN 600 MHz a été déterminante pour l'analyse spectrale de ces produits. Cet appareillage a ainsi permis l'obtention de spectres RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY) sur 0,19 mg de produit (trigocherrine D (**115**)) et de spectres $^{13}C$ exploitables à partir de 0,48 mg de produit (trigocherriolide D (**121**)). La détermination structurale de produits en quantités inférieures au milligramme aurait été impossible sans cet équipement et l'expertise de Marie-Thérèse Martin, spectroscopiste RMN à l'ICSN.

Les composés (**112-121**) sont des diterpénoïdes daphnane orthoesters hautement oxygénés. Ils se distinguent des DDO isolés jusqu'à présent par la présence d'un motif chloro ou dichloro vinyle $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane. La numérotation des trigocherrines se base sur la numérotation convenue pour les diterpènes de type daphnane. Les trois cycles adjacents à 5,7 et 6 carbones, sont nommés cycles A, B et C, respectivement. Voir Fig. 102, page 125.

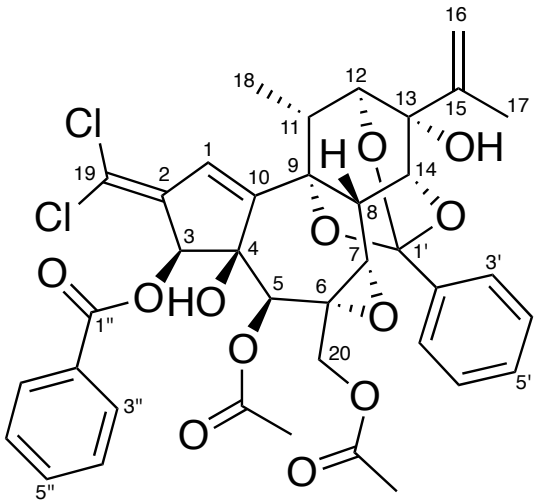
Dans les sections suivantes, l'étude structurale des composés isolés de *Trigonostemon cherrieri* sera exposée. L'analyse de la trigocherrine A (**112**) et du trigocherriolide A (**118**) sera détaillée, l'étude des autres produits mettra, quant à elle, l'accent sur les différences structurales observées par rapport à ces composés.

L'ensemble des spectres RMN 1D et 2D réalisés sont donnés en Annexe 7 (page 311), pour la trigocherrine A (**112**) et en Annexe 8 (page 319) pour le trigocherriolide A (**118**). Les spectres RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ des autres composés isolés de *Trigonostemon cherrieri* sont donnés en Annexe 9 (page 325).

Les déplacements chimiques RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ sont résumés dans le tableau 21 en Annexe 10 (page 335) pour l'ensemble des trigocherrines et dans le tableau 22 en Annexe 11 (page 337) pour l'ensemble des trigocherriolides

Pour faciliter la lecture, les structures des composés (**112-121**) sont représentées sur le volet dépliant de l'Annexe 12, page 339.

#### 2.1.4.1 Trigocherrine A (112)




Trigocherrine A (**112**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 755,1657 correspondant à la formule brute $C_{38}H_{36}Cl_2O_{12}$ (masse moléculaire calculée 755,1662), indiquant la présence de 20 degrés d'insaturations. Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **112**.

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** En accord avec la formule brute, 38 carbones sont identifiés sur le spectre RMN $^{13}$C (Fig 148). Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC (page 314) et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 38 carbones et mettent en évidence la présence de 4 méthyles, 2 méthylènes (dont 1 oléfinique), 18 méthines (dont 5 oxygénées et 11 oléfiniques) et 14 carbones quaternaires (3 carbonyles d'ester, 5 oxygénés et 6 oléfiniques). Voir tableau 14.

Les spectres $^1$H, $^{13}$C et HSQC révèlent la présence d'un motif isopropényle C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 141,8, 116,1, 18,5) et $H_2$-16, $H_3$-17 ($\delta_H$ 4,93 et 5,19, s, 2H et 1,82, s, 3H), respectivement. (En rouge clair sur la figure 147). Les déplacements chimiques et le système AB formé par les protons $H_2$-20 ($\delta_H$ 3,52 et 4,76, d (12,2), 2H), indiquent la présence d'un oxyméthylène connecté à un carbone asymétrique (en vert sur la figure 147). Deux hydroxyles à $\delta_H$ 2,97 et 3,88 sont mis en évidence par l'absence de

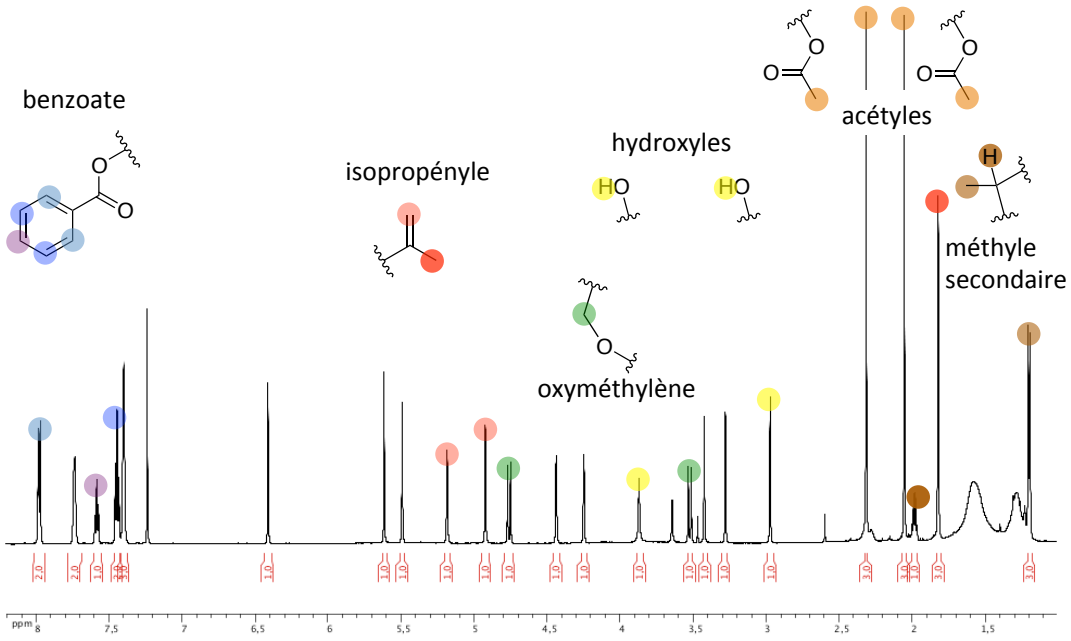



**Figure 147.** Spectre RMN $^{1}$H de la trigocherrine A (**112**) (600 MHz, $CDCl_3$)

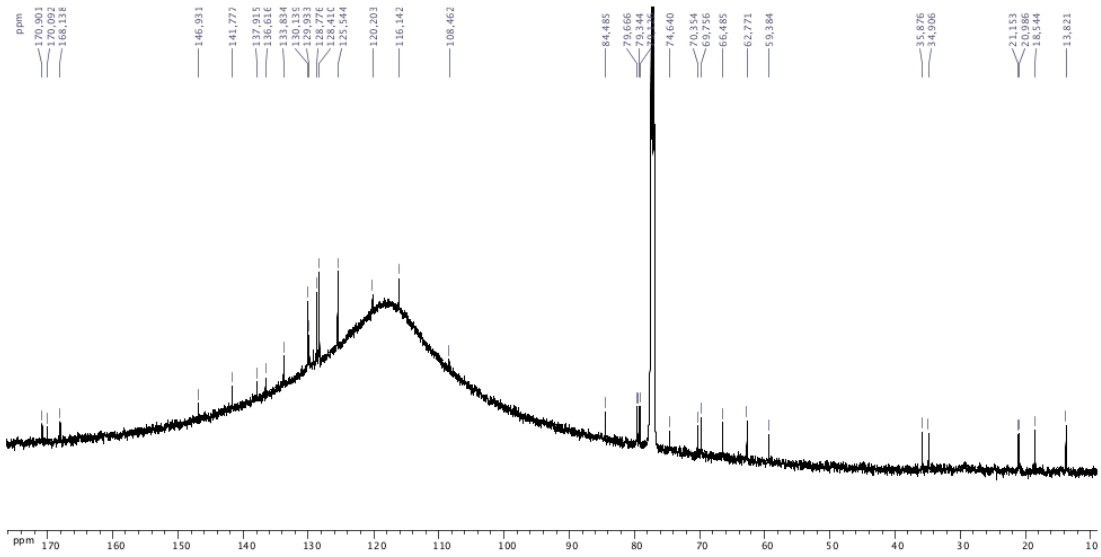


**Figure 148.** Spectre RMN $^{13}$C de la trigocherrine A (**112**) (150 MHz, $CDCl_3$)

**Tableau 14.** Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C de la trigocherrine A (**112**) (600 MHz, $CDCl_3$)

| no. | $\delta_C$ | $\delta_H$, mult., ($J$ en Hz) |
|---|---|---|
| 1 | 128.4 | 6.41, s |
| 2 | 136.6 | - |
| 3 | 79.1 | 5.62, s |
| 4 | 84.5 | - |
| 5 | 69.8 | 5.50, s |
| 6 | 59.4 | - |
| 7 | 62.8 | 3.28, s |
| 8 | 34.9 | 3.43, s |
| 9 | 74.6 | - |
| 10 | 146.9 | - |
| 11 | 35.9 | 1.99, q, (7.0) |
| 12 | 79.7 | 4.25, br s |
| 13 | 70.4 | - |
| 14 | 79.3 | 4.44, br s |
| 15 | 141.8 | - |
| 16 | 116.1 | 5.19, s |
| | | 4.93, s |
| 17 | 18.5 | 1.82, s |
| 18 | 13.8 | 1.20, d, (7.0) |
| 19 | 120.2 | - |
| 20 | 66.5 | 4.76, d, (12.2) |
| | | 3.52, d, (12.2) |
| 1′ | 108.5 | - |
| 2′ | 137.9 | - |
| 3′ | 125.5 | 7.74, m |
| 4′ | 128.4 | 7.40, m |
| 5′ | 129.9 | 7.40, m |
| 6′ | 128.4 | 7.40, m |
| 7′ | 125.5 | 7.74, m |
| 1″ | 168.1 | - |
| 2″ | 129.3 | - |
| 3″ | 130.1 | 7.98, d, (7.6) |
| 4″ | 128.8 | 7.45, t, (7.6) |
| 5″ | 133.8 | 7.59, t, (7.6) |
| 6″ | 128.8 | 7.45, t, (7.6) |
| 7″ | 130.1 | 7.98, d, (7.6) |
| 4-OH | - | 2.97, s |
| 13-OH | - | 3.88, br s |
| 5-OAc | 170.1, 21.2 | 2.32, s |
| 20-OAc | 170.9, 21.0 | 2.06, s |

corrélations $^{1}J_{C-H}$ sur le spectre HSQC pour ces deux protons (en jaune sur la figure 147). Deux acétyles sont également identifiés ($\delta_C$ 170,9 et 21,0 $\delta_H$ 2,06, s) et ($\delta_C$ 170,1 et 21,2 $\delta_H$ 2,32, s) (en orange sur la figure 147). Les couplages caractéristiques d'un méthyle secondaire H-18 ($\delta_H$ 1,20, d (7,0), 3H) et du proton associé H-11 ($\delta_H$ 1,99, q (7,0)) sont observés (en marron sur la figure 147). Enfin on peut constater la présence d'un substituant benzoyloxy (en violet sur la figure 147).

Les données spectroscopiques précédentes et l'appartenance du genre *Trigonostemon* à la famille des Euphorbiaceae laisse supposer la nature diterpénique du composé **112**. L'observation d'un carbone quaternaire à $\delta_C$ 108,5, caractéristique d'un orthobenzoate en position 9,12,14,[201] nous oriente vers un squelette daphnane de type DDO modifié.

**Analyse du spectre RMN 2D HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** Comme on peut le voir sur le spectre $^{1}$H (Fig. 147), à l'exception de protons des cycles aromatiques, de l'oxyméthylène et du méthyle secondaire, aucun couplage scalaire homonucléaire proton-proton n'est observé. La structure plane de la trigocherrine A (**112**) et la position des groupes fonctionnels est donc déterminée exclusivement grâce aux corrélations hétéronucléaires HMBC. (Fig. 149)

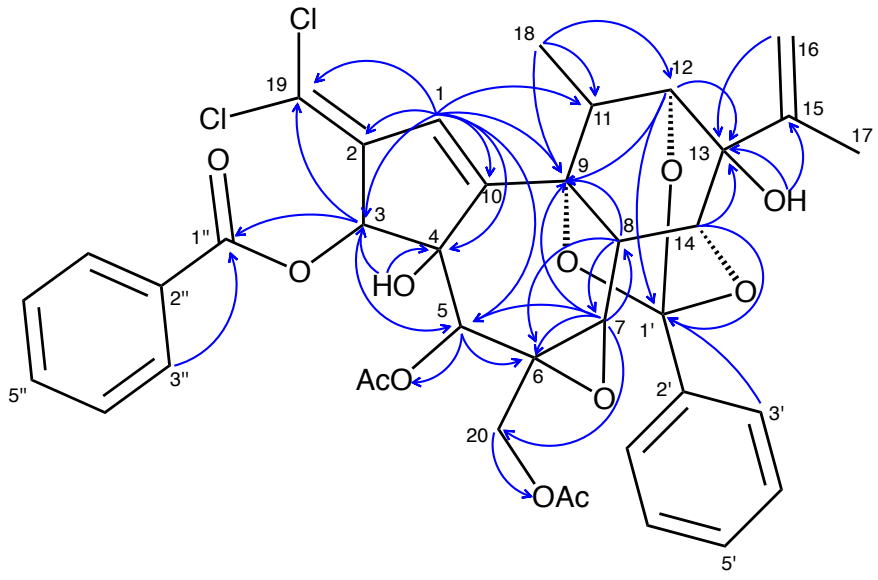



**Figure 149.** Principales corrélations HMBC du composé **112**

Le méthyle secondaire est positionné en C-11 de par les corrélations HMBC de $CH_3$-18 vers C-9, C-11 et C-12. La présence d'un époxyde trisubstitué en 6,7 est déterminée

par les déplacements chimiques des carbones C-6 et C-7 ($\delta_C$ 59,4 et 62,8, respectivement) et par les multiples corrélations HMBC de H-7 vers C-6, C-8, C-9 et C-20, de H-20 vers C-7 et de H-8 vers C-6 et C-7. Le groupement benzoate a été positionné en C-3 ($\delta_C$ 79,1) grâce aux corrélations communes de H-3 ($\delta_H$ 5,62) et des protons H-3″ et H-7″ ($\delta_H$ 7,98) avec le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 168,1). Les deux acétoxyles sont placés en C-5 ($\delta_C$ 69,8) et C-20 ($\delta_C$ 66,5) en se basant sur les corrélations HMBC de H-5 ($\delta_H$ 2,32) et H-20 ($\delta_H$ 2,06) vers les carbonyles correspondants à $\delta_C$ 170,1 et 170,9, respectivement. Les deux protons d'hydroxyles à 2,97 et 3,89 ppm sont assignés aux 4-OH et 13-OH de par leurs corrélations avec C-4 ($\delta_C$ 84,5) et C-13 ($\delta_C$ 70,4), respectivement.

Les trois carbones oxygénés restants sont assignés aux positions C-9 ($\delta_C$ 74,6), C-12 ($\delta_C$ 79,7) et C-14 ($\delta_C$ 79,3) portant l'orthoester. Le motif orthobenzoate en 9,12,14 est confirmé par les corrélations HMBC de H-12 ($\delta_H$ 4,25), H-14 ($\delta_H$ 4,44), H-3′ et H-7′ ($\delta_H$ 7,74) avec le carbone quaternaire caractéristique de l'orthobenzoate à $\delta_C$ 108,5.

Le placement des substituants précédents laisse 2 atomes de chlore et 2 degrés d'insaturation à disposer sur la structure. Deux motifs structuraux sont possibles et permettent de répondre aux multiples corrélations HMBC de H-1 ($\delta_H$ 6,41) vers C-2, C-3, C-4, C-5, C-9, C-10, C-11 et C-19. Voir Fig. 150. C'est l'observation ultérieure d'un couplage $^1J_{\mathrm{C-H}}$ important (voir page 184), caractéristique d'un chlorure de vinyle, chez le trigocherriolide A (**118**), qui ne possède qu'un seul atome de chlore en position 19, qui permettra de valider le motif dichlorovynilique $\alpha,\beta$-insaturé comme faisant partie de la structure plane de la trigocherrine A (**112**). D'autre part, cette proposition est en accord avec la chimiotaxonomie de *T. cherrieri*, la structure plane représentant alors le squelette daphnane qui a été isolé plusieurs fois du genre *Trigonostemon*.

**Figure 150.** Motifs de substitutions des chlores répondant aux contraintes HMBC observées pour la trigocherrine A (**112**)

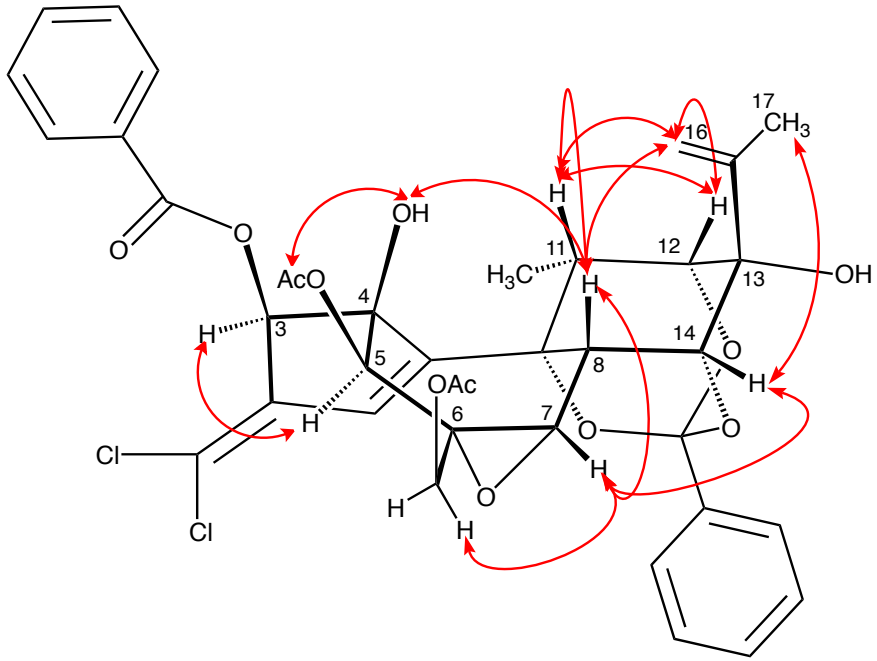



**Figure 151.** Principales corrélations ROESY du composé **112**

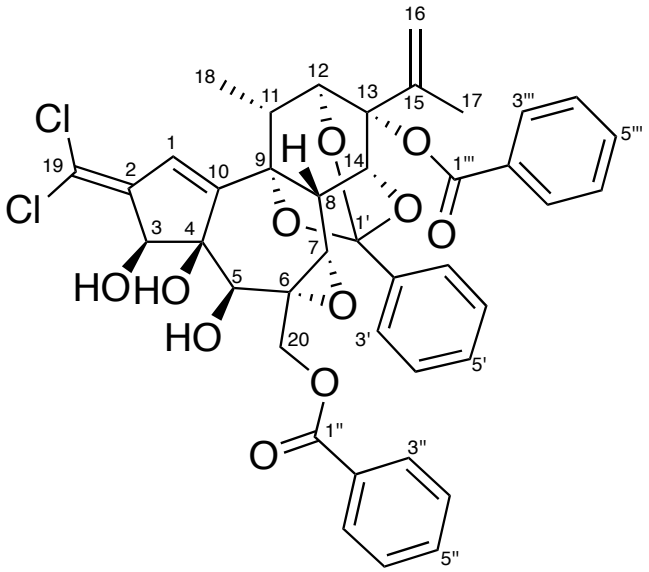
**Analyse du spectre RMN 2D ROESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** La structure tridimensionnelle de la trigocherrine A (**112**) a été déterminée à partir des corrélations observées sur le spectre ROESY. (Fig. 151)

Les corrélations ROESY observées entre H-12/H-11, H-11/H-8, H-8/OH-4, OH-4/OAc-5, $H_2$-20/H-7, H-7/H-8 et H-7/H-14 indiquent que ces protons ont la même orientation que nous avons arbitrairement fixée comme étant $\beta$ pour la série des trigocherrines. En conséquence, la corrélation ROESY entre H-3/H-5 suggère que ceux-ci sont orientés en $\alpha$. La corrélation entre H-14 et Me-17 et les multiples corrélations $H_2$-16/H-8, $H_2$-16/H-11 et $H_2$-16/H-12 indiquent la position axiale de l'isopropényle en C-13.

La configuration relative de la trigocherrine A a été déterminée comme étant 3*S**,-4*R**,5*R**,6*S**,7*S**,8*S**,9*R**,11*R**,12*S**,13*S**,14*R**.

#### 2.1.4.2 Trigocherrine B (113)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ *m/z* 797,1602 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}Na$ (masse moléculaire calculée 797,1532). Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+Na]^+$ et $[M+Na+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **113**.




Trigocherrine B (**113**)

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 41 carbones observés et mettent en évidence la présence de 2 méthyles, 2 méthylènes (dont 1 oléfinique), 23 méthines (dont 5 oxygénées et 16 oléfiniques) et 14 carbones quaternaires (2 carbonyles d'ester, 5 oxygénés et 7 oléfiniques). Voir tableau 21 en Annexe 10 (page 335).

Comme pour la trigocherrine A (**112**), le spectre $^1$H révèle la présence d'un motif isopropényle [C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 138,6, 119,9, 18,8) et H-16, H-17 ($\delta_H$ 5,34 et 5,46, s, 2H et 1,90, s, 3H), respectivement], d'un oxyméthylène [H-20 ($\delta_H$ 3,52 et 4,76, d (12,2), 2H)] et d'un méthyle secondaire [H-18 ($\delta_H$ 1,20, d (7,0), 3H)] et du proton associé [H-11 ($\delta_H$ 1,99, q (7,0))].

Les différences visibles sur le spectres $^{1}$H entre **113** et la trigocherrine A (**112**) tiennent à la présence d'un benzoate supplémentaire et à l'absence d'acétoxyle chez **113**.

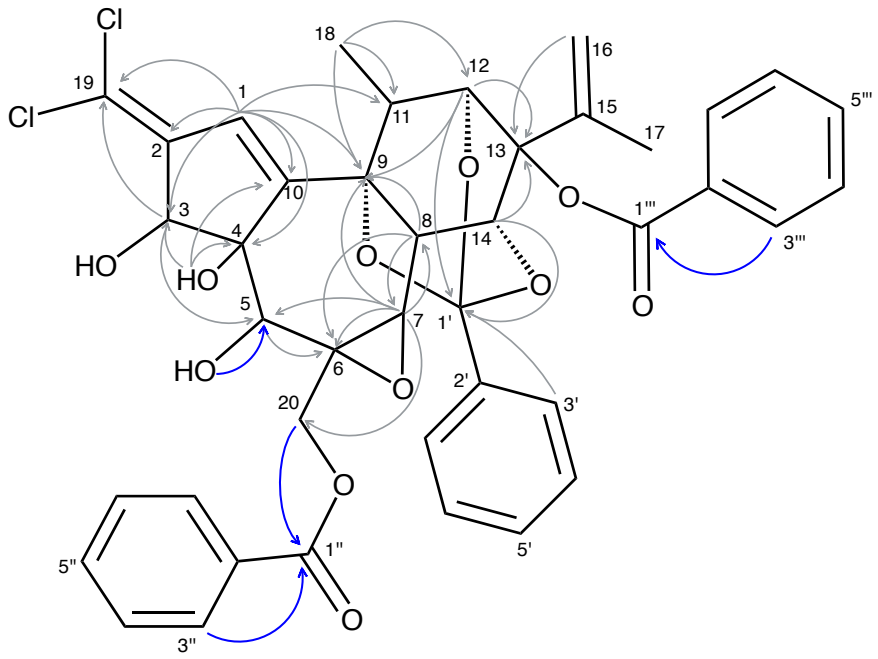



**Figure 153.** Principales corrélations HMBC de la trigocherrine B (**113**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**)

**Analyse du spectre RMN 2D HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde trisubstitué en 6,7, de l'isopropényle en C-13, d'un orthobenzoate en 9,12,14 ainsi que la présence du motif dichlorovinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane sont établis par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**), en grisé sur la figure 153.

Deux protons d'hydroxyles sont assignés à 4-OH ($\delta_H$ 3,89, s) et 5-OH ($\delta_H$ 3,70, d (8,0)) de par leur corrélation avec C-4 ($\delta_C$ 82,8) et C-5 ($\delta_C$ 70,6), respectivement.

Un premier groupement benzoate a été positionné en C-20 ($\delta_C$ 67,3) grâce aux corrélations de $H_2$-20 ($\delta_H$ 5,07 et 4,12, d (12,1), 2H) et des protons H-3″ et H-7″ ($\delta_H$ 8,04) avec le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 167,2). Exceptées celles des protons aromatiques H-3‴ et H-7‴, aucune corrélation HMBC n'est observée avec le carbonyle C-1‴ ($\delta_C$ 165,5)

du deuxième groupement benzoate, suggérant une liaison avec un carbone quaternaire. Le déblindage du carbone quaternaire C-13 ($\delta_C$ 79,0) contre 70,4 pour la trigocherrine A (**112**) indiquent la présence du groupement benzoate à cette position.

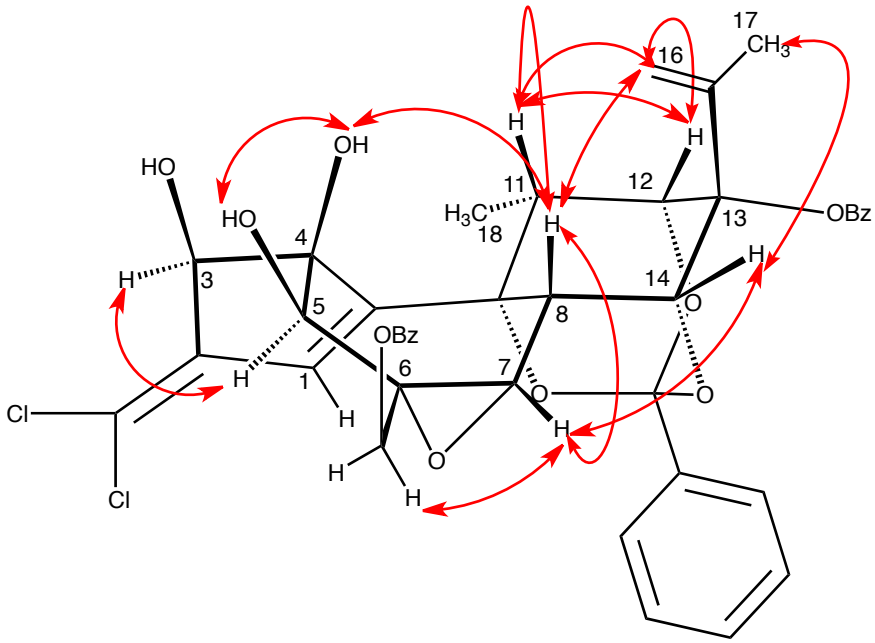
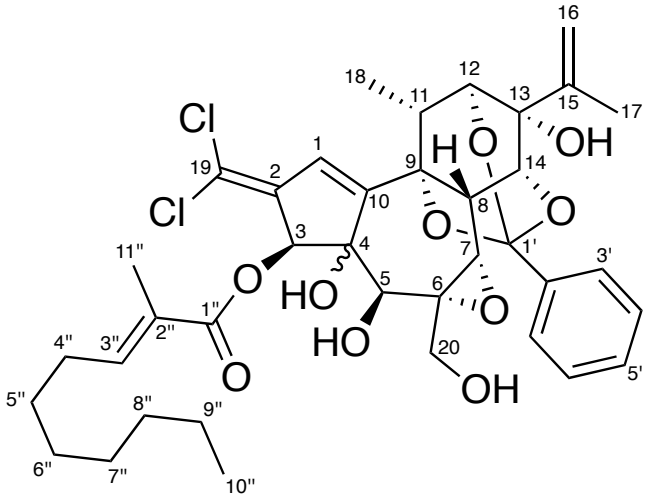



**Figure 154.** Principales corrélations NOESY de la trigocherrine B (**113**)

**Analyse du spectre RMN 2D NOESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** La structure tridimensionnelle de la trigocherrine B (**113**) a été déterminée à partir des corrélations observées sur le spectre NOESY. (Fig. 154)

Les mêmes corrélations NOESY que celles observées pour le composé **112** nous permettent d'attribuer la configuration relative suivante à la trigocherrine B : 3$S$*,-4$R$*,5$R$*,6$S$*,7$S$*,8$S$*,9$R$*,11$R$*,12$S$*,13$S$*,14$R$*.

### 2.1.4.3 Trigocherrine C (114)




Trigocherrine C (**114**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 733,2513 correspondant à la formule brute $C_{38}H_{47}Cl_2O_{10}$ (masse moléculaire calculée 733,2546). Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **114**.

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 38 carbones observés et mettent en évidence la présence de 4 méthyles, 8 méthylènes (dont 1 oléfinique), 14 méthines (dont 5 oxygénées et 7 oléfiniques) et 12 carbones quaternaires (1 carbonyle d'ester, 5 oxygénés et 6 oléfiniques). Voir tableau 21 en Annexe 10 (page 335).

Comme pour la trigocherrine A (**112**), le spectre $^1$H révèle la présence d'un motif isopropényle [C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 141,9, 116,0, 18,5) et H-16, H-17 ($\delta_H$ 4,94 et 5,20, s, 2H et 1,84, s, 3H), respectivement], d'un oxyméthylène [H-20 ($\delta_H$ 3,75 et 3,93, d (12,2), 2H)] et d'un méthyle secondaire [H-18 ($\delta_H$ 1,19, d (7,0), 3H)] et du proton associé [H-11 ($\delta_H$ 2,02, q (7,0))].

Les différences entre **114** et la trigocherrine A (**112**) tiennent à l'estérification par une chaine aliphatique à la place du benzoate et à l'absence d'acétyle chez **114**.

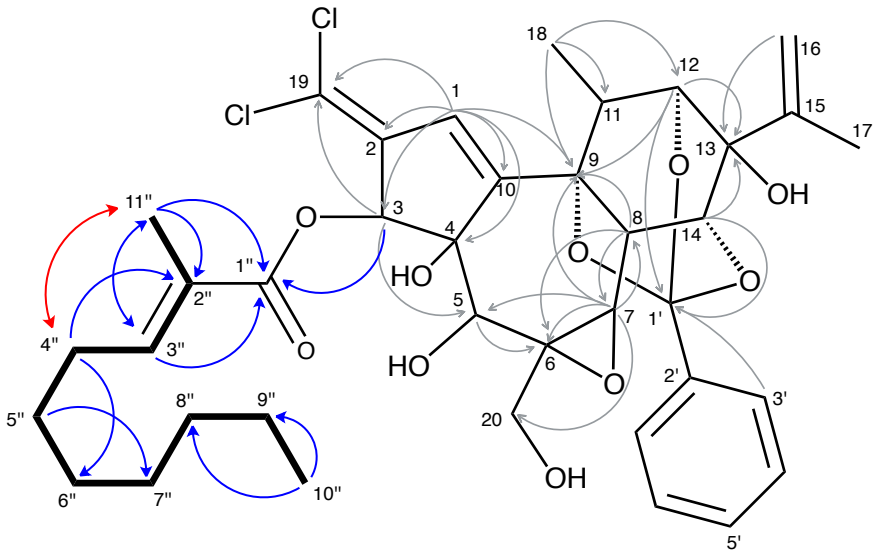



**Figure 156.** Principales corrélations COSY (en gras), HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**) et NOESY (en rouge) de la trigocherrine C (**114**)

**Analyse du spectre RMN 2D COSY et HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde trisubstitué en 6,7, de l'isopropényle en C-13, d'un orthobenzoate en 9,12,14 ainsi que la présence du motif dichlorovinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane sont établis par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**).

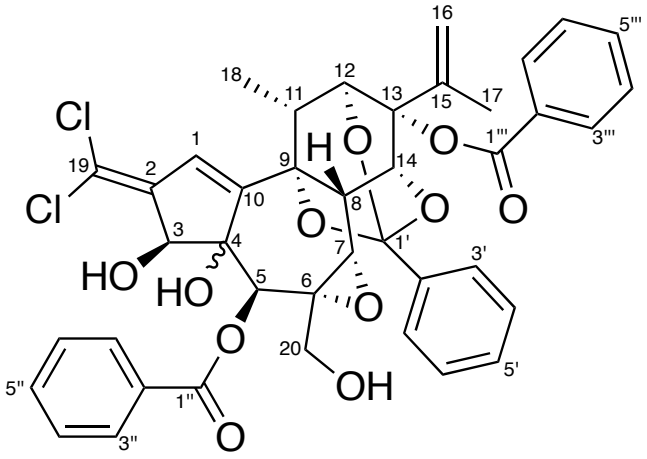
Aucun des hydroxyles n'est visible lors de l'acquisition dans le $CDCl_3$. La masse exacte du produit et les déplacements chimiques des carbones C-4, C-5, C-13 et C-20 ($\delta_C$ 83,4, 72,8, 70,4 et 65,5, respectivement) nous permettent néanmoins de positionner 4 hydroxyles en C-4, C-5, C-13 et C-20.

Des signaux caractéristiques de méthylènes sur le spectre $^1$H indiquent la présence d'une chaine aliphatique saturée. Celle-ci est construite à partir des corrélations homonucléaires COSY entre les protons du méthyle en C-11″ et les protons H-3″, H-4″, H-5″, H-6″, H-7″, H-8″, H-9″ et les protons du méthyle en C-10″ (en gras sur la figure 156). Les corrélations HMBC du méthyle terminal caractéristique C-10″ ($\delta_C$ 14,3 et $\delta_H$ 0,87, t (7,0)) vers C-9″ ($\delta_C$ 22,8) et C-8″ ($\delta_C$ 32,1), de H-4″ ($\delta_H$ 2,18, q (7,0)) vers C-6″ ($\delta_C$ 29,7) et de H-5″ ($\delta_H$ 1,43, t (7,0)) vers C-7″ ($\delta_C$ 29,3) confirment l'enchainement des atomes dans cette partie aliphatique de la chaine latérale. La présence d'un méthyle

oléfinique en C-11″ ($\delta_C$ 12,6 et $\delta_H$ 1,80, s) est indiquée par les corrélations HMBC de H-11″ vers C-2″ ($\delta_C$ 126,6) et C-3″ ($\delta_C$ 145,5). Les corrélations HMBC de H-11″, H-3″ ($\delta_H$ 6,80, t, (7,0)) et H-3 ($\delta_H$ 5,47, s) vers le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 169,5) indiquent que l'estérification à lieu au niveau du carbone C-3 ($\delta_C$ 79,3) du cycle A.

**Analyse du spectre RMN 2D NOESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** Ici l'absence des signaux correspondant aux hydroxyles nous empêche de déterminer la stéréochimie relative en C-4. La géométrie de la double liaison $\Delta^{2''}$ est déterminée comme étant *E* sur la base de la corrélation NOESY entre le méthyle en 11″ et le méthylène en 4″. Pour les autres centres chiraux, les même corrélations NOESY que celles observées pour le composé **112** nous permettent d'attribuer la configuration relative présentée page 172 à la trigocherrine C (**114**).

#### 2.1.4.4 Trigocherrine D (115)




Trigocherrine D (**115**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 775,1769 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}$ (masse moléculaire calculée 775,1713). Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **115**. Le composé **115** est un isomère de la trigocherrine B (**113**).

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 41 carbones observés et mettent en évidence la présence de 2 méthyles, 2 méthylènes (dont 1 oléfinique), 23 méthines (dont 5 oxygénées et 16 oléfiniques) et 14 carbones quaternaires (2 carbonyles d'ester, 5 oxygénés et 7 oléfiniques). Voir tableau 21 en Annexe 10 (page 335).

Comme pour la trigocherrine A (**112**), le spectre $^1$H révèle la présence d'un motif isopropényle [C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 138,3, 120,0, 18,9) et H-16, H-17 ($\delta_H$ 5,39 et 5,49, s, 2H et 1,92, s, 3H), respectivement], d'un oxyméthylène [H-20 ($\delta_H$ 3,60 et 3,81, d (12,2), 2H)] et d'un méthyle secondaire [H-18 ($\delta_H$ 1,24, d (7,0), 3H)] et du proton associé [H-11 ($\delta_H$ 2,14, q (7,0))].

Comme la trigocherrine B (**113**), le composé **122** est substitué par deux benzoates.

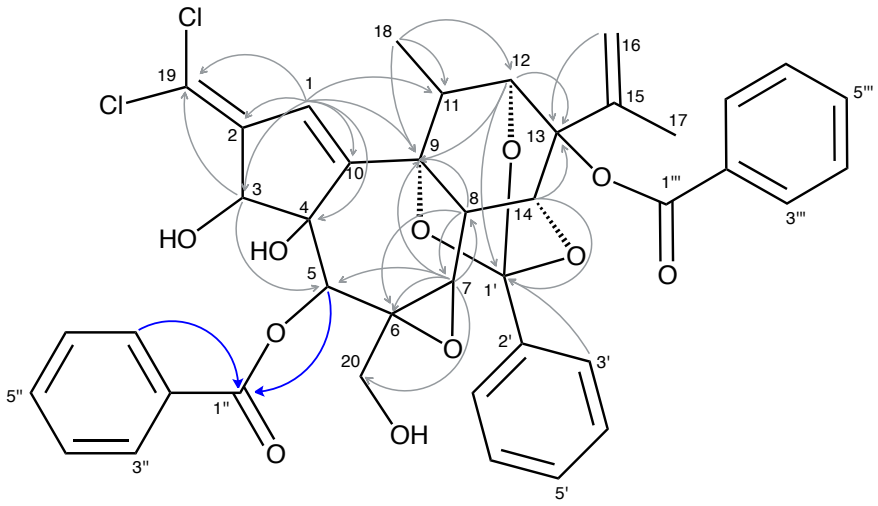



**Figure 158.** Principales corrélations HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**) du composé **115**

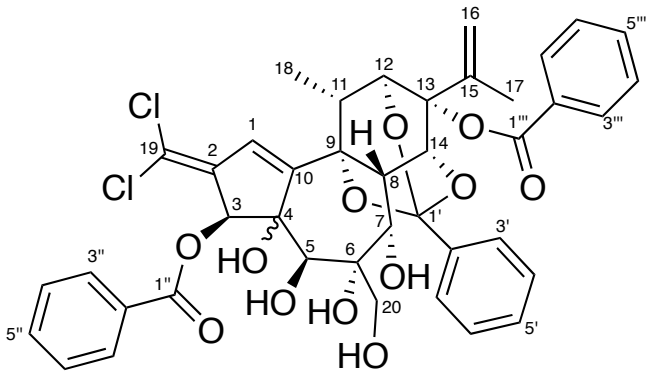
**Analyse du spectre RMN 2D HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde trisubstitué en 6,7, de l'isopropényle en C-13, d'un orthobenzoate en 9,12,14 ainsi que la présence du motif dichlorovinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane sont établis par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**).

Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), les hydroxyles ne sont pas visibles et ce sont la masse exacte du produit et les déplacements chimiques des carbones C-3, C-4 et C-20 ($\delta_C$ 76,5, 83,5 et 72,2, respectivement) qui nous permettent de positionner 3 hydroxyles en C-3, C-4 et C-20.

Le premier groupement benzoate est positionné en C-5 ($\delta_C$ 72,2) grâce aux corrélations HMBC de H-5 ($\delta_H$ 5,49, s) et des protons H-3″ et H-7″ ($\delta_H$ 8,12) avec le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 166,1). Comme pour la trigocherrine B (**113**), l'absence de corrélation HMBC de protons du squelette daphnane avec le carbonyle C-1‴ ($\delta_C$ 165,5) indique une substitution au niveau d'un carbone quaternaire. Le déplacement chimique élevé du carbone quaternaire C-13 ($\delta_C$ 79,1) contre 70,4 pour la trigocherrine A (**112**) indique la présence du second groupement benzoate en C-13.

**Analyse du spectre RMN 2D ROESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), l'absence des signaux d'OH nous empêche de déterminer la stéréochimie relative en C-4. Pour les autres centres chiraux, les même corrélations ROESY que celles observées pour la trigocherrine A (**112**) nous permettent d'attribuer la configuration relative présentée page 175 à la trigocherrine D (**115**).

### 2.1.4.5 Trigocherrine E (116)




Trigocherrine E (**116**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 793,1888 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{38}Cl_2O_{12}$ (masse moléculaire calculée 793,1819). Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **116**.

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC mettent en évidence la présence de 2 méthyles, 2 méthylènes (dont 1 oléfinique), 23 méthines (dont 5 oxygénées et 16 oléfiniques) et 14 carbones quaternaires (2 carbonyles d'ester, 5 oxygénés et 7 oléfiniques). Voir tableau 21 en Annexe 10 (page 335).

Comme pour la trigocherrine A (**112**), le spectre $^1$H révèle la présence d'un motif isopropényle [C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 137,6, 120,1, 18,8) et H-16, H-17 ($\delta_H$ 5,28 et 5,34, s, 2H et 1,79, s, 3H), respectivement], d'un oxyméthylène [H-20 ($\delta_H$ 3,70 et 4,05, d (10,9), 2H)] et d'un méthyle secondaire [H-18 ($\delta_H$ 1,29, d (7,0), 3H)] et du proton associé [H-11 ($\delta_H$ 2,28, m)].

Comme la trigocherrine B (**113**), le composé **116** est substitué par deux benzoates.

**Analyse du spectre RMN 2D HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'isopropényle en C-13, d'un orthobenzoate en 9,12,14 ainsi que la présence du motif dichloro-

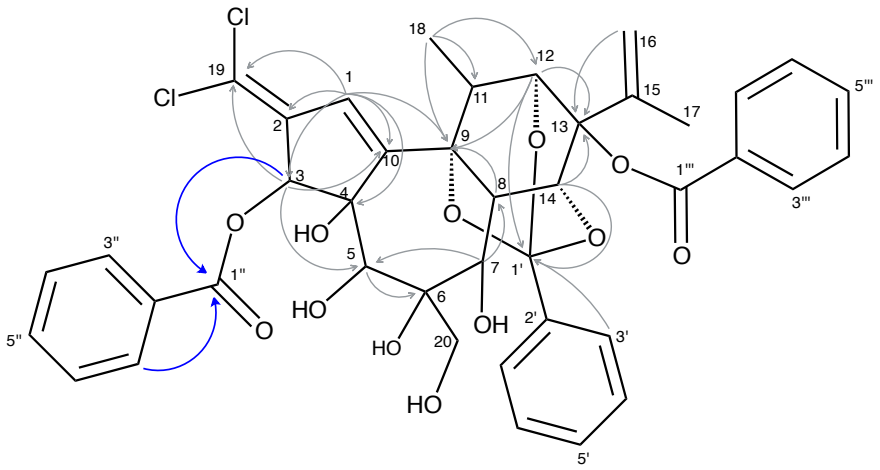



**Figure 160.** Principales corrélations HMBC (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**) du composé **116**

vinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane sont établis par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**).

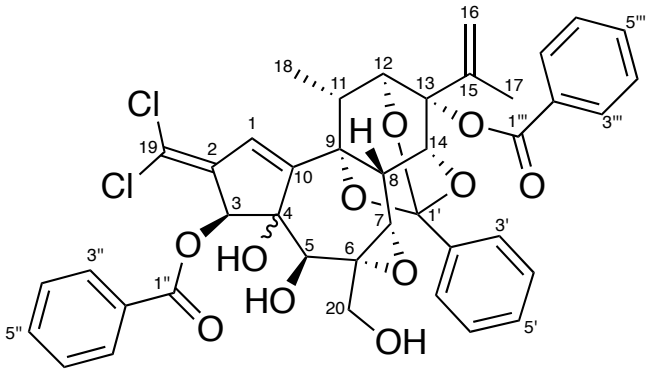
Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), les hydroxyles ne sont pas visibles et ce sont la masse exacte du produit et les déplacements chimiques des carbones C-4, C-5, C-6, C-7 et C-20 ($\delta_C$ 87,4, 74,2, 76, 80,4 et 69,6, respectivement) qui nous permettent de positionner 5 hydroxyles en C-4, C-5, C-6, C-7 et C-20. Ici, contrairement au reste des molécules isolées de *Trigonostemon cherrieri*, l'époxyde en 6,7 est absent. La trigocherrine E (**116**) provient vraisemblablement d'une hydrolyse de la trigocherrine F (**117**) au niveau de l'époxyde en 6,7.

Le premier groupement benzoate est cette fois-ci positionné en C-3 ($\delta_C$ 78,3) grâce aux corrélations HMBC de H-3 ($\delta_H$ 6,11, s) et des protons H-3″ et H-7″ ($\delta_H$ 8,03) avec le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 167,4). Comme pour la trigocherrine B (**113**), l'absence de corrélation HMBC entre les protons du squelette daphnane et le carbonyle C-1‴ ($\delta_C$ 165,1) indique une substitution au niveau d'un carbone quaternaire. Le déplacement chimique élevé du carbone quaternaire C-13 ($\delta_C$ 78,9) contre 70,4 pour la trigocherrine A (**112**) indique la présence du groupement second groupement benzoate en C-13.

**Analyse du spectre RMN 2D ROESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), l'absence des signaux d'OH nous empêche de déterminer la stéréochimie relative en

C-4. Pour les autres centres chiraux, les même corrélations ROESY que celles observées pour la trigocherrine A (**112**) nous permettent d'attribuer la configuration relative présentée page 178 à la trigocherrine E (**116**).

#### 2.1.4.6 Trigocherrine F (117)




Trigocherrine F (**117**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 775,1785 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}$ (masse moléculaire calculée 775,1713). Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **117**. Le composé **117** est un isomère de la trigocherrine B (**113**).

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** Les couplages en $^1J$ C-H observés sur le spectre HSQC et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 41 carbones observés et mettent en évidence la présence de 2 méthyles, 2 méthylènes (dont 1 oléfinique), 23 méthines (dont 5 oxygénées et 16 oléfiniques) et 14 carbones quaternaires (2 carbonyles d'ester, 5 oxygénés et 7 oléfiniques). Voir tableau .

Comme pour la trigocherrine A (**112**), le spectre $^1$H révèle la présence d'un motif isopropényle [C-15, C-16, C-17 ($\delta_C$ 138,3, 120,0, 18,8) et H-16, H-17 ($\delta_H$ 4,98 et 5,35, s, 2H et 1,81, s, 3H), respectivement], d'un oxyméthylène [H-20 ($\delta_H$ 3,68 et 3,99, d (12,0), 2H)] et d'un méthyle secondaire [H-18 ($\delta_H$ 1,27, d (7,0), 3H)] et du proton associé [H-11 ($\delta_H$ 2,11, q (7,0))].

Comme la trigocherrine B (**113**), le composé **117** est substitué par deux benzoates.

**Analyse du spectre RMN 2D HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde

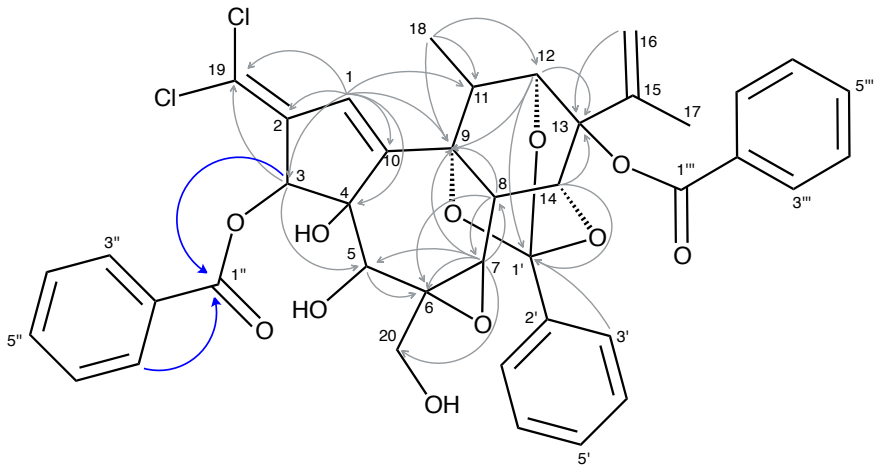



**Figure 162.** Principales corrélations HMBC de la trigocherrine F (**117**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **113**)

trisubstitué en 6,7, de l'isopropényle en C-13, d'un orthobenzoate en 9,12,14 ainsi que la présence du motif dichlorovinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A du squelette daphnane sont établis par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**).

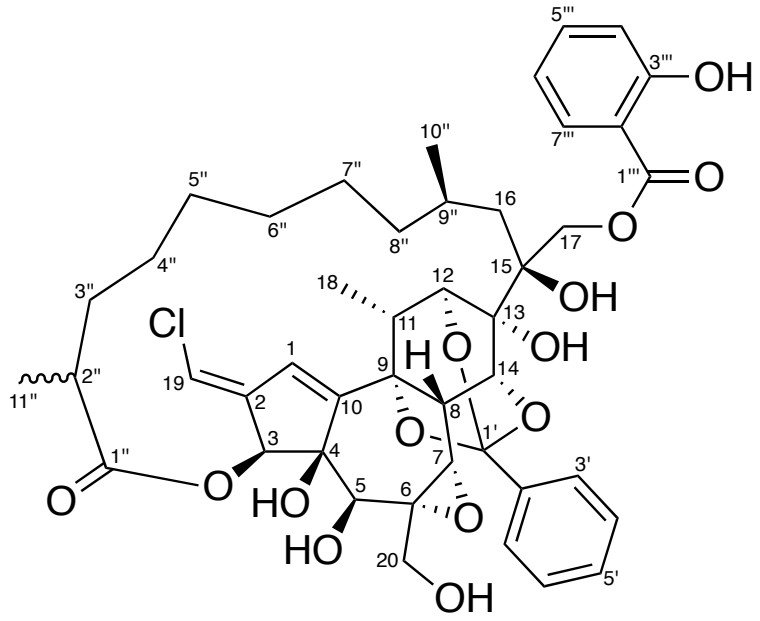
Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), les hydroxyles ne sont pas visibles et ce sont la masse exacte du produit et les déplacements chimiques des carbones C-4, C-5 et C-20 ($\delta_C$ 83,6, 72,7 et 65,8, respectivement) qui nous permettent de positionner 3 hydroxyles en C-4, C-5 et C-20.

Là encore, le premier groupement benzoate est positionné en C-3 ($\delta_C$ 79,7) grâce aux corrélations HMBC de H-3 ($\delta_H$ 5,73, s) et des protons H-3″ et H-7″ ($\delta_H$ 8,03) avec le carbonyle C-1″ ($\delta_C$ 167,9). Comme pour la trigocherrine B (**113**), l'absence de corrélation HMBC entre les protons du squelette daphnane et le carbonyle C-1‴ ($\delta_C$ 165,5) indique une substitution au niveau d'un carbone quaternaire. Le déplacement chimique élevé du carbone quaternaire C-13 ($\delta_C$ 79,1) contre 70,4 pour la trigocherrine A (**112**) indique la présence du groupement second groupement benzoate en C-13.

**Analyse du spectre RMN 2D ROESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** Comme dans le cas de la trigocherrine C (**114**), l'absence des signaux d'OH nous empêche de déterminer la stéréochimie relative en C-4. Pour les autres centres chiraux, les même corrélations ROESY que celles observées

pour le composé **112** nous permettent d'attribuer la configuration relative présentée page 181 à la trigocherrine F (**117**).

### 2.1.4.7 Trigocherriolide A (118)




Trigocherriolide A (**118**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode négatif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ $m/z$ 875,3089 correspondant à la formule brute $C_{45}H_{53}ClO_{14}Na$ (masse moléculaire calculée 875,3021), indiquant la présence de 19 degrés d'insaturation. Le ratio de 3:1 entre les intensités des pics $[M\text{-}H]^-$ et $[M\text{-}H+2]^-$ confirme la présence d'un seul atome de chlore dans le composé **118**.

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** En accord avec la formule brute, 45 carbones sont identifiés sur le spectre RMN $^{13}$C (Fig 148). Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC (Annexe 8, page 325) et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 45 carbones et mettent en évidence la présence de 3 méthyles, 9 méthylènes, 20 méthines (dont 5 oxygénées et 11 oléfiniques) et 13 carbones quaternaires (2 carbonyles d'ester, 7 oxygénés et 4 oléfiniques). Voir tableau 15.

Le spectre $^1$H révèle la présence de 3 méthyles secondaires et de leur proton associé en C-18, C-11″ et C-10″ [(Me-18 $\delta_H$ 1,20, d (7,0) et H-11 $\delta_H$ 2,73, q (7,0)), (Me-11″ $\delta_H$ 1,14, d (7,0) et H-2″ $\delta_H$ 2,43, m) et (Me-10″ $\delta_H$ 1,05, d (7,0) et H-9″ $\delta_H$ 1.68, m),

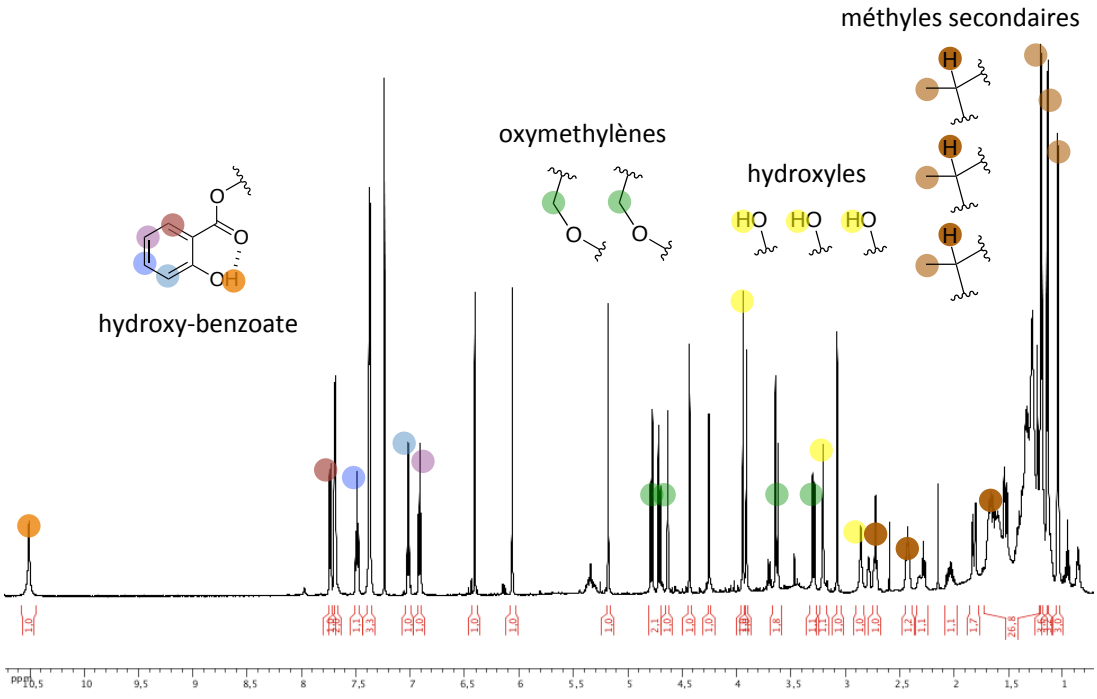



**Figure 164.** Spectre RMN $^{1}$H du trigocherriolide A (**118**) (600 MHz, $CDCl_3$)

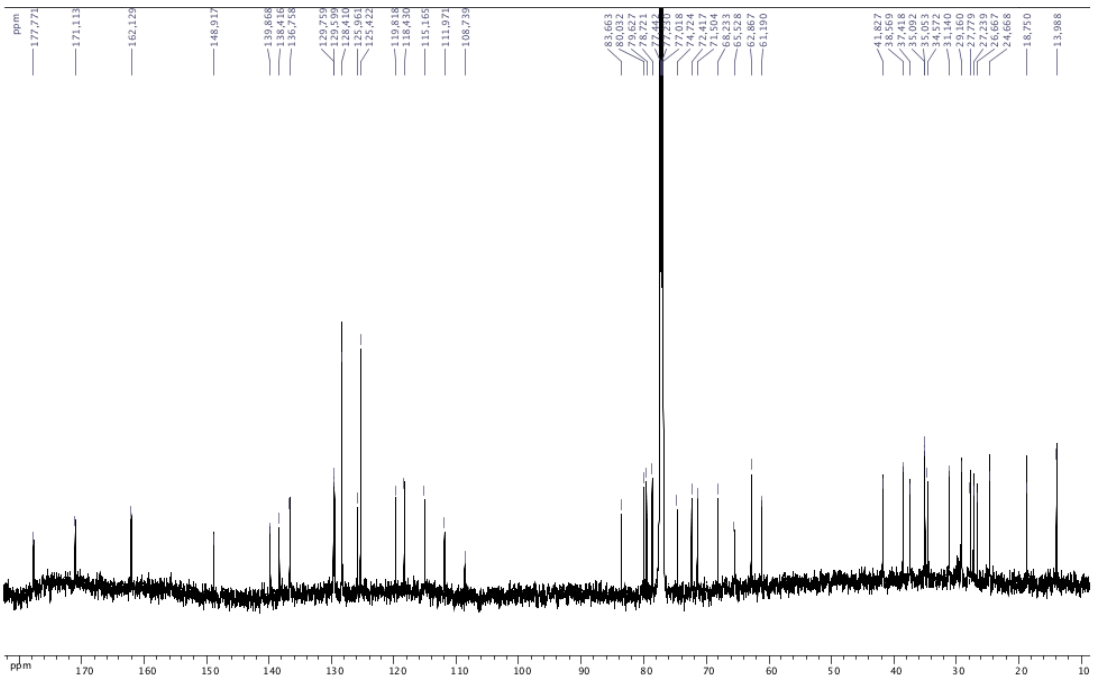


**Figure 165.** Spectre RMN $^{13}$C du trigocherriolide A (**118**) (150 MHz, $CDCl_3$)

**Tableau 15.** Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C du trigocherriolide A (**118**) (600 MHz, $CDCl_3$)

| no. | $\delta_C$ | $\delta_H$, mult., ($J$ en Hz) | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$, mult., ($J$ en Hz) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 126.0 | 6.41, s | $1'$ | 108.7 | - |
| 2 | 139.9 | - | $2'$ | 138.4 | - |
| 3 | 78.7 | 5.18, s | $3'$ | 125.4 | 7.70, m |
| 4 | 83.7 | - | $4'$ | 128.4 | 7.38, m |
| 5 | 71.5 | 3.91, s | $5'$ | 129.8 | 7.38, m |
| 6 | 61.2 | - | $6'$ | 128.4 | 7.38, m |
| 7 | 62.9 | 3.08, s | $7'$ | 125.4 | 7.70, m |
| 8 | 34.6 | 4.44, br s | $1''$ | 177.8 | - |
| 9 | 74.7 | - | $2''$ | 41.8 | 2.43, m |
| 10 | 148.9 | - | $3''$ | 35.1 | 1.65, m |
| 11 | 35.1 | 2.73, q (7.1) | | | 1.31, m |
| 12 | 79.6 | 4.26, br s | $4''$ | 31.1 | 1.68 – 1.23, m |
| 13 | 72.4 | - | $5''$ | 26.7 | 1.68 – 1.23, m |
| 14 | 80.0 | 4.64, br s | $6''$ | 29.2 | 1.68 – 1.23, m |
| 15 | 77.2 | - | $7''$ | 27.2 | 1.68 – 1.23, m |
| 16 | 37.4 | 1.82, dd (15.0, 4.5) | $8''$ | 38.6 | 1.38, m |
| | | 1.53, dd (15.0, 4.5) | | | 1.28, m |
| 17 | 68.2 | 4.79, d (12.1) | $9''$ | 27.8 | 1.68, m |
| | | 4.71, d (12.1) | $10''$ | 24.7 | 1.05, d (6.6) |
| 18 | 14.0 | 1.20, d (7.0) | $11''$ | 18.8 | 1.14, d (7.0) |
| 19 | 115.2 | 6.07, s | $1'''$ | 171.1 | - |
| 20 | 65.5 | 3.63, d (12.3) | $2'''$ | 112.0 | - |
| | | 3.29, d (12.3) | $3'''$ | 162.1 | - |
| | | | $4'''$ | 118.4 | 7.02, d (8.3) |
| | | | $5'''$ | 136.8 | 7.49, ddd (8.3, 7.3, 1.5) |
| | | | $6'''$ | 119.8 | 6.92, ddd (8.3, 7.3, 1.5) |
| | | | $7'''$ | 129.6 | 7.74, dd (8.3, 1.5) |
| | | | 4-OH | - | 3.20 |
| | | | 13-OH | - | 3.95 |
| | | | 15-OH | - | 2.86 |

respectivement], en marron sur la figure 164. Les déplacements chimiques des protons de deux systèmes AB caractéristiques d'oxyméthylènes connectés à un carbone asymétrique sont observés en C-17 ($\delta_C$ 68,2 et $\delta_H$ 4.79 et 4.71, d (12.1)) et C-20 ($\delta_C$ 65,5 et $\delta_H$ 3,63 et 3,29, d (12.3)) (en vert sur la figure 164). Trois hydroxyles à $\delta_H$ 2,86, 3,20 et 3,95 sont mis en évidence par l'absence de corrélation $^1J_{\mathrm{C-H}}$ sur le spectre HSQC pour ces trois protons (en jaune sur la figure 164). Enfin, on peut observer les signaux et couplages caractéristiques d'un *ortho*-hydroxybenzoate (en violet et orange, pour le proton de l'OH-3‴ formant une liaison hydrogène avec le carbonyle C-1‴, sur la figure 164).

**Analyse du spectre RMN 2D COSY et HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde trisubstitué en 6,7 et de l' orthobenzoate en 9,12,14 et la structure générale du squelette diterpénique sont établies par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**), en grisée sur la figure 167.

Contrairement aux trigocherrines de la série non-macrocyclique, le composé **118** présente un seul atome de chlore au niveau de la double liaison exocyclique en C-3. Les corrélations HMBC de H-19 ($\delta_H$ 6,07, s) vers C-1, C-2 et C-3 ($\delta_C$ 126,0, 139,9 et 78,7, respectivement) permettent de placer celui-ci en position géminale de l'atome de Cl. La valeur élevée du couplage $^1J_{\mathrm{C-H}}$ observée entre H-19 et C-19 sur le spectre HMBC (195,2 Hz) est caractéristique d'un chlorure de vinyle.[274] (Fig. 166)

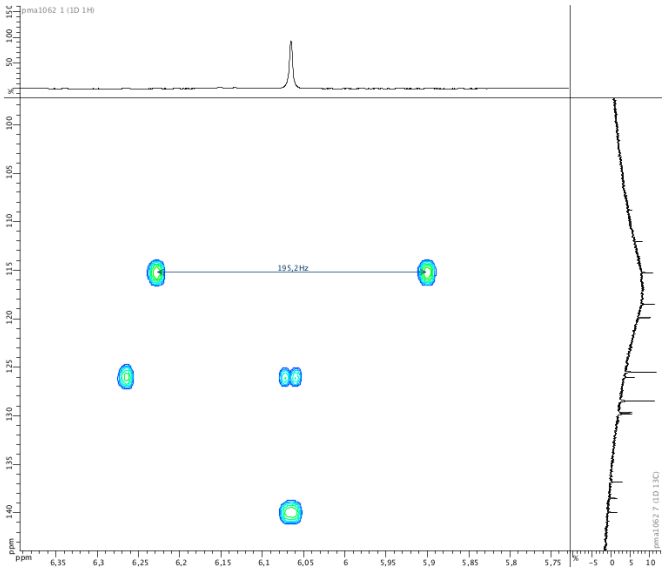



**Figure 166.** Constante de couplage $^1J_{\mathrm{C-H}}$ observée entre H-19 et C-19 (spectre HMBC du composé **118**)

Trois des cinq hydroxyles non-aromatiques du composé **118** sont visibles sur le spectre $^1$H. Les signaux à $\delta_H$ 3,20, 3,95 et 2,86 sont attribués aux protons d'hydroxyles

274. Watts, V. S. ; Goldstein, J. H. *Theor. Chim. Acta*, **1966**, *4* 265–272.

4-OH, 13-OH et 15-OH sur la base de leur corrélation HMBC avec les carbones C-4 ($\delta_C$ 83,7), C-13 ($\delta_C$ 72,4) et C-15 ($\delta_C$ 77,2), respectivement. Les déplacements chimiques des carbones C-5 ($\delta_C$ 71,5) et C-20 ($\delta_C$ 65,5) nous permettent de positionner les deux hydroxyles restant en C-5 et C-20.

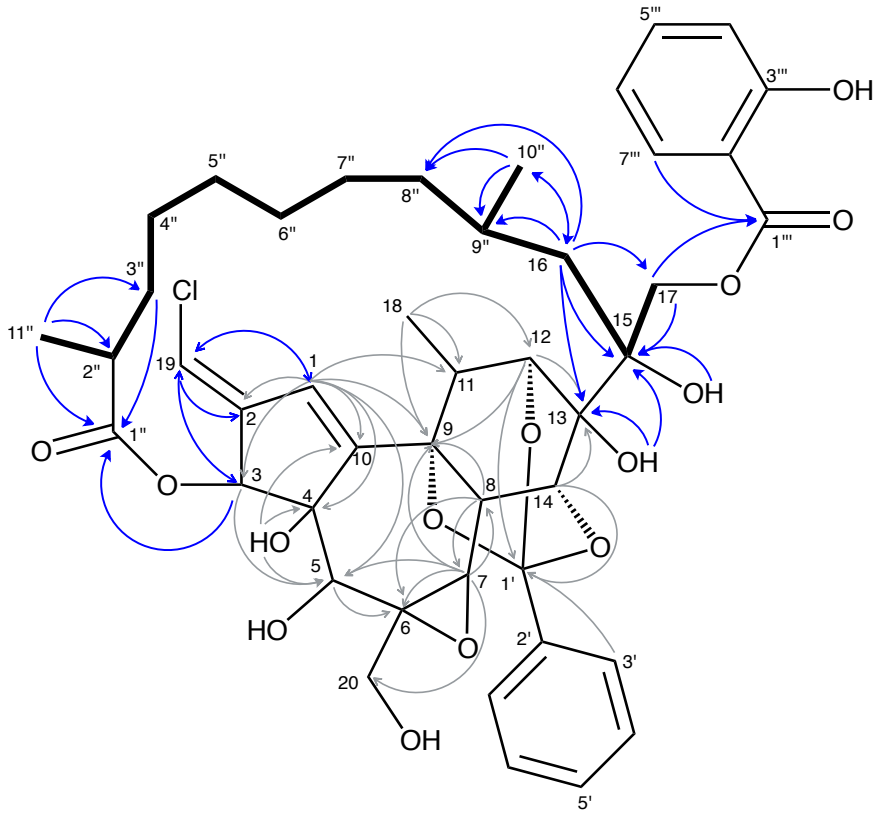



**Figure 167.** Principales corrélations HMBC du trigocherriolide A (**118**) (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **112**)

Les corrélations communes de H-3 ($\delta_H$ 5,18, s), $H_2$-3″ et Me-11″ vers le carbonyle C-1″ mettent en évidence l'estérification du squelette daphnane en position 3 par un substituant aliphatique.

Les corrélations HMBC des protons du Me-11″ vers les carbones C-2″ ($\delta_C$ 41,8) et C-3″ ($\delta_C$ 18,8) nous permettent d'amorcer la construction d'une chaîne de carbones saturés. Le squelette carboné de cette chaîne aliphatique est construit par l'enchaînement des corrélations homonucléaires COSY entre les méthylènes (en gras sur la figure 167), celles-ci mettent en évidence une succession de 6 carbones (C-3″ à C-8″) jusqu'au carbone C-9″ portant le troisième méthyle secondaire Me-10″.

La position de Me-10″ est établie par les corrélations HMBC des protons de Me-10″ ($\delta_H$ 7,98) vers les carbones C-8″ ($\delta_C$ 38,6), C-9″ ($\delta_C$ 27,8) et C-16 ($\delta_C$ 37,4). La proximité du méthylène en C-16 est confirmée par les corrélations HMBC de $H_2$-16 ($\delta_H$ 1,82 et 1,53, dd (15,0, 4,5)) vers C-8″, C-9″ et C-10″ ($\delta_C$ 24,7). D'autre part, les protons du méthylène $H_2$-16 corrèlent également avec les carbones C-13 ($\delta_C$ 72,4), C-15 ($\delta_C$ 77,2) et C-17 ($\delta_C$ 68,2).

Les corrélations HMBC des protons H-12 ($\delta_H$ 4,26, br s) et H-14 ($\delta_H$ 4,64, br s) avec C-13, qui porte un hydroxyle, nous permettent de définir ce carbone quaternaire comme étant le second point d'ancrage sur le squelette daphnane du substituant aliphatique estérifiant la position C-3. On observe ainsi une macrolactone formée d'une chaîne de 11 carbones, étendue à partir du carbone C-16 et lactonisée en C-3.

Les multiples corrélations HMBC de 13-OH, 15-OH, $H_2$-16 et $H_2$-17 ($\delta_H$ 4,79 et 4,71, d (12,1)) vers C-15 permettent de définir celui-ci comme un carbone quaternaire oxygéné portant un substituant de type oxyméthylène ($CH_2$-17).

Enfin, les corrélations HMBC communes de $H_2$-17 et H-7‴ ($\delta_H$ 7,74, dd (8,3, 1,5)) vers le carbonyle C-1‴ ($\delta_C$ 171,1) nous permettent de placer l'*ortho*-hydroxybenzoate observé sur le spectre $^1$H en position 17.

**Analyse du spectre RMN 2D NOESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative** La structure tridimensionnelle du trigocherriolide A (**118**) a été déterminée à partir des corrélations observées sur le spectre NOESY et de la modélisation tridimensionnelle du composé **118** sur le logiciel Avogadro. [1] (Fig. 151)

**▶ Stéréochimie relative du squelette diterpénique**

Les corrélations NOESY observées entre H-12/H-11, H-11/H-8, H-8/OH-4, $H_2$-20/H-7, H-7/H-8 et H-7/H-14 indiquent que ces protons ont la même orientation que nous avons arbitrairement fixée comme étant $\beta$. En conséquence la corrélation NOESY observée entre H-3/H-5 suggère que ceux-ci sont orientés en $\alpha$. Ces corrélations sont identiques à celles observées chez la trigocherrine A (**112**), elles sont représentées par des flèches grisées sur la figure 168.

On observe une corrélation NOESY entre le proton vinylique H-19 et le proton H-3 (flèche rouge sur la figure 168) qui nous permet de définir la stéréochimie de la double

1. Avogadro : outil de construction et de visualisation moléculaire libre. Version 1.03. `http://avogadro.openmolecules.net/`

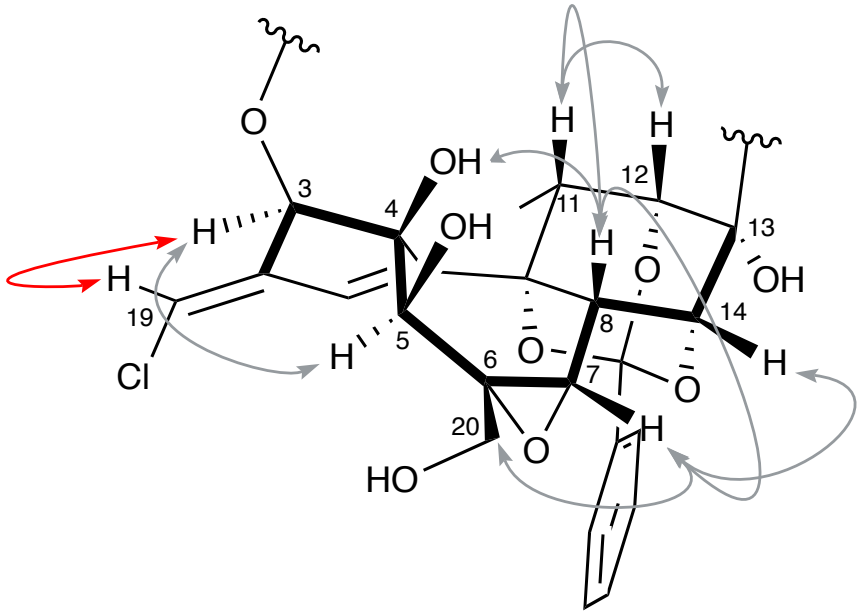



**Figure 168.** Principales corrélations NOESY du squelette diterpénique du composé **118**. En grisé, les corrélations communes au composé **112**

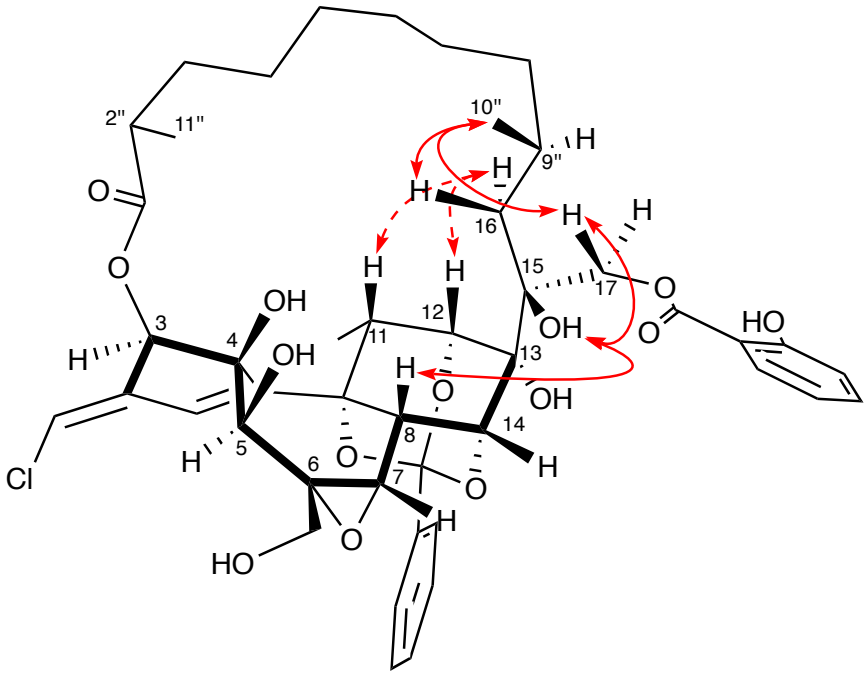



**Figure 169.** Principales corrélations NOESY de la partie macrocylique du composé **118**

liaison comme étant *(E)*.

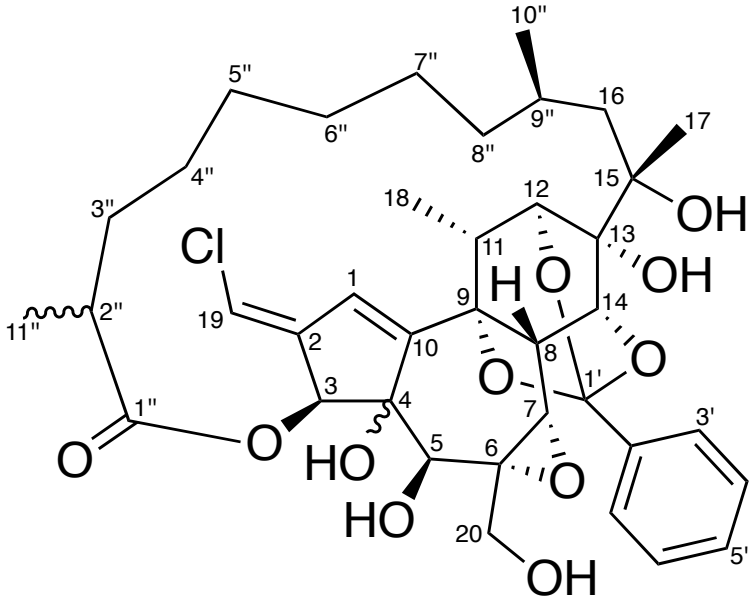
▶ **Stéréochimie relative de la macrolactone**

Le cycle macrolactonique portant deux méthyles secondaires et un substituant méthylène-*ortho*-hydroxybenzoate génère trois centres chiraux supplémentaires par rapport à la trigocherrine A (**112**). Ici, la diastéréotopie des protons des méthylènes en $H_2$-16 et $H_2$-17 permet dans chaque cas de distinguer clairement les deux protons.

Les corrélations NOESY H-8/15-OH, H-11/H-16$\alpha$ et H-12/H-16$\alpha$ indiquent une orientation axiale du macrocyle en C-13. De plus, la corrélation H-8/15-OH suggèrent une orientation $\beta$ de l'OH en 15. Les corrélations 15-OH/H-17$\beta$, H-17$\beta$/Me-10$''$ et H-16$\beta$/Me-10$''$ suggèrent également une orientation $\beta$ du méthyle 10$''$.

Le méthyle secondaire en 2$''$ est par contre trop éloigné d'un autre centre stéréogène pour pouvoir observer des corrélations NOESY. Nous ne pouvons déterminer sa stéréochimie .

### 2.1.4.8 Trigocherriolide B (119)




Trigocherriolide B (**119**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 717,3062 correspondant à la formule brute $C_{38}H_{49}ClO_{11}$ (masse moléculaire calculée 717,3042), indiquant la présence de 14 degrés d'insaturation. Le ratio de 3:1 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence d'un seul atome de chlore dans le composé **119**.

**Analyse des spectres RMN 1D ($^1$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC) : détermination de la nature des substituants** En accord avec la formule brute, 38 carbones sont identifiés sur le spectre RMN $^{13}$C. Les couplages $^1J_{C-H}$ observés sur le spectre HSQC et les déplacements chimiques des carbones permettent de classer les 38 carbones et mettent en évidence la présence de 4 méthyles, 8 méthylènes, 16 méthines (dont 5 oxygénées et 7 oléfiniques) et 10 carbones quaternaires (1 carbonyle d'ester, 6 oxygénés et 3 oléfiniques). Voir tableau 22 en Annexe 11 (page 337).

Le spectre $^1$H révèle la présence de 3 méthyles secondaires et de leur proton associé en C-18, C-2″ et C-9″ [(Me-18 $\delta_H$ 1,20, d (7,0) et H-11 $\delta_H$ 2,67, m), (Me-11″ $\delta_H$ 1,16, d (7,0) et H-2″ $\delta_H$ 2,41, m) et (Me-10″ $\delta_H$ 1,01, d (7,0) et H-9″ $\delta_H$ 1,59, m), respectivement]. Les

déplacements chimiques des protons du système AB caractéristique d'un oxyméthylène connecté à un carbone asymétrique sont observés en C-20 ($\delta_C$ 65,1 et $\delta_H$ 3,75 et 3,82, m). Les hydroxyles sont mal résolus (signaux larges), on peut cependant supposer leur présence à $\delta_H$ 2,15, 3,39 et 3,80 (pas de corrélation $^1J$ C-H sur le spectre HSQC pour ces trois massifs).

Globalement, le composé **119** semble très proche structuralement du trigocherriolide A (**118**) Les différences tiennent en l'absence du motif *ortho*-hydroxybenzoate et la présence d'un méthyle tertiaire Me-17 ($\delta_H$ 1,36, s).

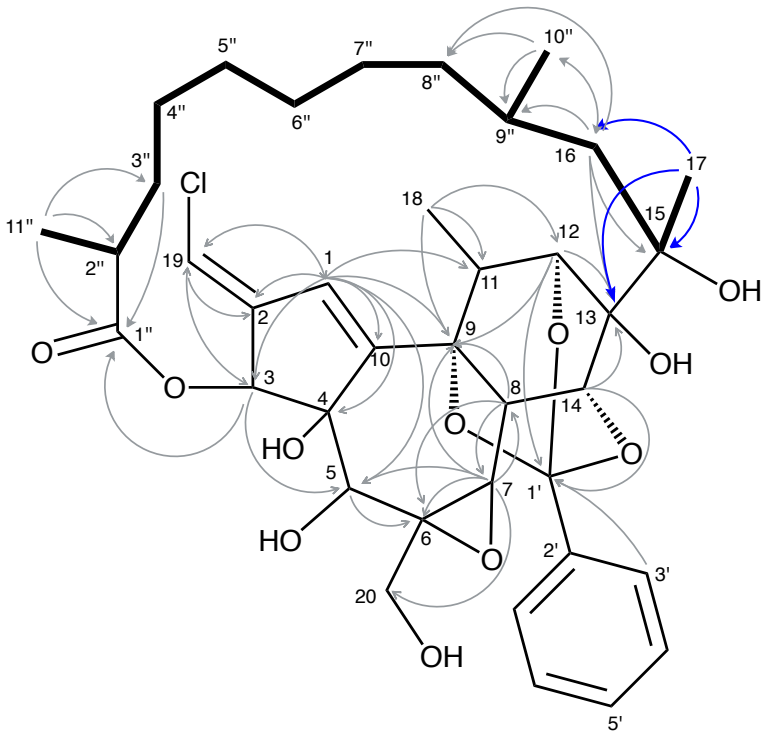



**Figure 171.** Principales corrélations HMBC du composé **119** (en bleu les corrélations additionnelles par rapport au composé **118**)

**Analyse du spectre RMN 2D COSY et HMBC : construction de la structure plane et position des substituants** La position du méthyle secondaire en C-11, de l'époxyde trisubstitué en 6,7 et de l' orthobenzoate en 9,12,14 et la structure générale du squelette diterpénique sont établies par les mêmes corrélations clées HMBC que celles observées pour la trigocherrine A (**112**), en grisée sur la figure 171.

Tout comme pour le trigocherriolide A (**118**), les corrélations HMBC de H-19 vers C-1, C-2 et C-3 permettent de placer celui-ci en position géminale de l'unique atome de chlore. La construction du macrocycle, son greffage en C-3 et C-13, ainsi que la position des méthyles secondaires en C-2″ et C-9″ se fait via les mêmes corrélations homonucléaires COSY et hétéronuclaires HMBC que celles observées dans le cas du trigocherriolide A (**118**) (en grisé sur la figure 171).

Les corrélations HMBC des protons de Me-17 vers C-13 ($\delta_C$ 72,3), C-15 ($\delta_C$ 75,9) et C16 ($\delta_C$ 38,8) permettent de placer ce méthyle en C-15. (Fig. 171)

La mauvaise résolution des protons d'hydroxyles sur le spectre $^1$H ne nous permet pas d'observer des corrélations HMBC nettes et il nous est par conséquent impossible d'attribuer avec précision les signaux d'OH. La masse exacte du produit et les déplacements chimiques des carbones C-4, C-5, C-13, C-15 et C-20 ($\delta_C$ 83,9, 72,2, 72,3, 75,9 et 65,1, respectivement) nous permettent de positionner cinq hydroxyles sur ces carbones.

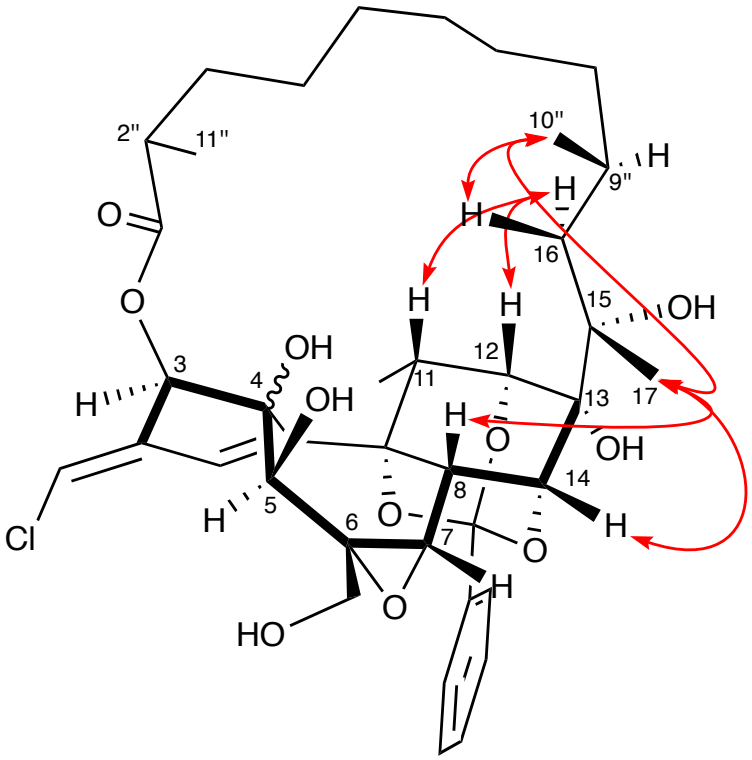



**Figure 172.** Principales corrélations NOESY de la partie macrocylique du composé **119**

**Analyse du spectre RMN 2D NOESY : construction du squelette dans l'espace et configuration relative**

▶ **Stéréochimie relative du squelette diterpénique**

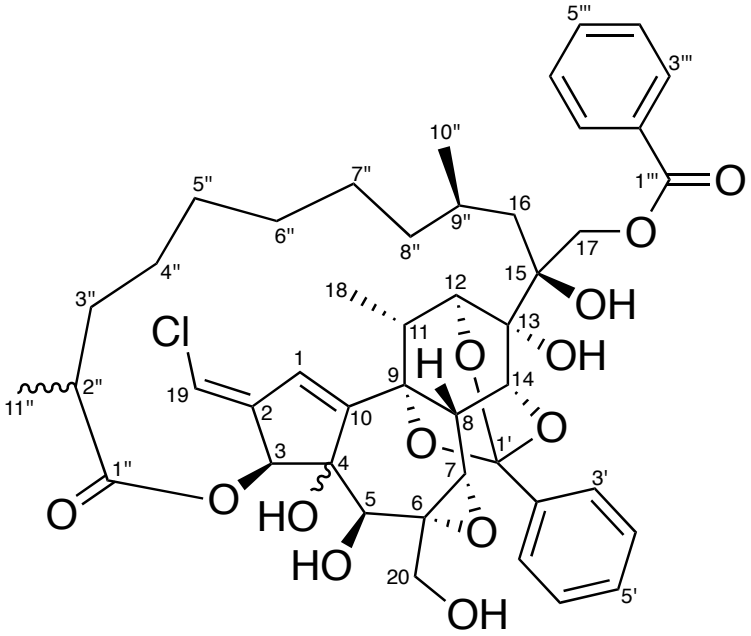
Comme pour le trigocherriolide A (**118**), les corrélations NOESY observées entre H-12/H-11, H-11/H-8, $H_2$-20/H-7, H-7/H-8 et H-7/H-14 indiquent que ces protons ont la même orientation, arbitrairement fixée comme étant $\beta$. En conséquence, la corrélation NOESY observée entre H-3/H-5 suggère que ceux-ci sont orientés en $\alpha$. La corrélation entre le proton vinylique H-19 et le proton H-3 nous permet de définir la stéréochimie de la double liaison comme étant *(E)*. Ces corrélations NOESY sont également observées pour le trigocherriolide B (**119**). La mauvaise résolution des hydroxyles sur le spectre $^1$H ne nous permet pas de définir la stéréochimie en C-4.

▶ **Stéréochimie relative de la macrolactone**

Les corrélations NOESY H-8/Me-17, H-14/Me-17, H-11/H-16$\alpha$ et H-12/H-16$\alpha$ indiquent une orientation axiale du macrocyle en C-13. Ici, les corrélations H-8/Me-17 et H-14/Me-17 suggèrent une orientation $\beta$ du méthyle en 15. Les corrélations Me-17/Me-10$''$ et H-16$\beta$/Me-10$''$ suggèrent également une orientation $\beta$ du méthyle en 9$''$.

Là encore, le méthyle secondaire en 2$''$ est trop éloigné d'un autre centre stéréogène pour pouvoir déterminer sa stéréochimie .

#### 2.1.4.9 Trigocherriolide C (120)



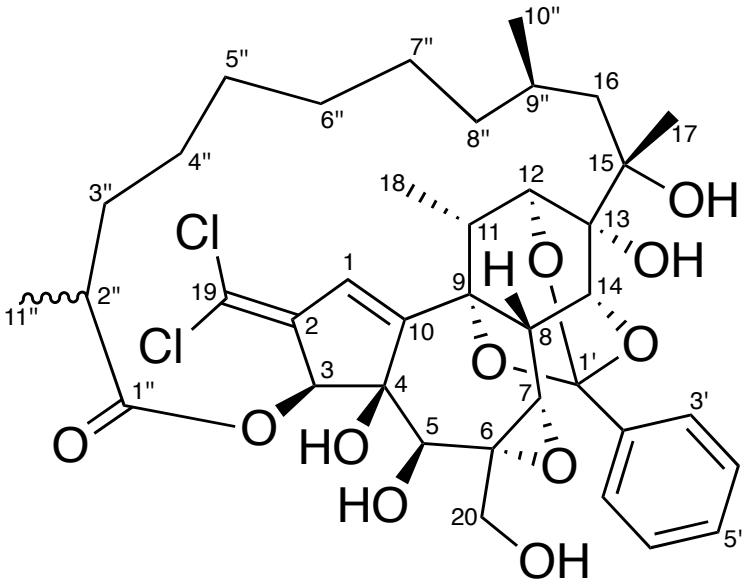

Trigocherriolide C (**120**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ *m/z* 837,3251 correspondant à la formule brute $C_{45}H_{53}ClO_{13}$ (masse moléculaire calculée 837,3253), indiquant la présence de 19 degrés d'insaturation. Le ratio de 3:1 entre les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+2]^+$ confirme la présence d'un seul atome de chlore dans le composé **120**.

En comparant les formules brutes du trigocherriolide A (**118**) ($C_{45}H_{52}ClO_{14}$) et du composé **120** ($C_{45}H_{53}ClO_{13}$), on constate la perte d'un atome d'oxygène. L'observation du spectre $^1H$ de **120** permet de constater la disparition de signaux caractéristiques de l'*ortho*-hydroxybenzoate observés pour le trigocherriolide A (**118**) pour ceux d'un benzoate. Le trigocherriolide C (**120**) est l'analogue 3‴-déoxy du trigocherriolide A (**118**).

A l'exception de celles concernant l'OH-4, toutes les corrélations homonucléaires COSY et NOESY et hétéronucléaires HSQC et HMBC observées pour le trigocherriolide A (**118**) sont retrouvées pour le trigocherriolide C (**120**) nous permettant ainsi de définir sa structure plane et sa stéréochimie comme décrites sur la figure ci-dessus.

#### 2.1.4.10 Trigocherriolide D (121)




Trigocherriolide D (**121**)

Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode négatif révèle un pic quasi-moléculaire [M-H]$^-$ *m/z* 749,2465 correspondant à la formule brute $C_{38}H_{48}Cl_2O_{11}$ (masse moléculaire calculée 749,2495), indiquant la présence de 14 degrés d'insaturation. Le ratio de 3:2 entre les intensités des pics [M+H]$^+$ et [M+H+2]$^+$ confirme la présence de deux atomes de chlore dans le composé **121**.

En comparant les formules brutes du trigocherriolide B (**119**) ($C_{38}H_{49}ClO_{11}$) et du composé **121** ($C_{38}H_{48}Cl_2O_{11}$), on constate la perte d'un hydrogène et la présence d'un chlore supplémentaire. L'observation du spectre $^1$H de **121** permet de constater la disparition du signal du proton H-19 à 6,04 ppm observé pour le trigocherriolide B (**119**). Le trigocherriolide D (**121**) est l'analogue 19-dichloro du trigocherriolide B.

Toutes les corrélations homonucléaires COSY et NOESY et hétéronucléaires HSQC et HMBC (sauf celles impliquant H-19) observées pour le trigocherriolide B (**119**) sont retrouvées pour le trigocherriolide D (**121**) nous permettant ainsi de définir sa structure plane et sa stéréochimie comme décrites sur la figure ci-dessus.

### Configuration relative de l'OH en 4

Pour les trigocherrines C, D, E et F (**114**, **115**, **116** et **117**) et les trigocherriolides B, C et D (**119**, **120** et **121**) le signal $^{1}$H de l'OH en position 4 n'est pas ou peu visible. Les données NOESY et ROESY ne permettent donc pas de déterminer la configuration relative du centre C-4. Cependant, les corrélations NOESY et ROESY observées entre OH-4/H-8 pour les trigocherrines A, B et le trigocherriolide A (**112**, **113** et **118**) permettent d'orienter l'OH-4 en $\beta$ chez ces trois composés. Les trigocherrines et trigocherriolides appartenant tous à la même série chimique et l'ensemble des autres corrélations NOESY et ROESY étant observées de façon identiques (suggérant une conformation similaire du squelette daphnane), nous orientons l'OH-4 en $\beta$ pour l'ensemble de la série, comme illustré pages 160, 161 et Annexe 12, page 339.

### Configuration relative de la macrolactone des trigocherriolides

Comme décrit pages 184 et 192 pour les trigocherriolides A et B (**118** et **119**), respectivement, les corrélations NOESY et ROESY observées suggèrent une orientation en $\beta$ du plan formé par la macrolactone pour le méthyle en 10$''$ et l'OH-15 (trigocherriolides A et C (**118** et **120**)) ou le méthyle 17 (trigocherriolides B et D (**119** et **121**)). Cependant, la grande flexibilité de la macrolactone implique vraisemblablement plusieurs conformations. Les configurations relatives des carbones asymétriques de la macrolactones déterminées dans la partie élucidation structurale sont donc des suggestions et nous ne fixons pas les configurations relatives en 15, 9$''$ et 2$''$ des trigocherriolides, comme illustré pages 160, 161 et Annexe 12, page 339.

### 2.1.5 Configuration absolue de la trigocherrine A (112)

Comme décrit précédemment (section 2.2 du chapitre 2, page 92) pour la chartacéone A (**49**), le calcul théorique des spectres de dichroïsme circulaire peut s'avérer être un outil efficace pour la détermination de configuration absolue de produits naturels.

L'étude configurationnelle de la trigocherrine A (**112**) s'est révélée plus aisée que celle des chartacéones pour deux raisons principales.

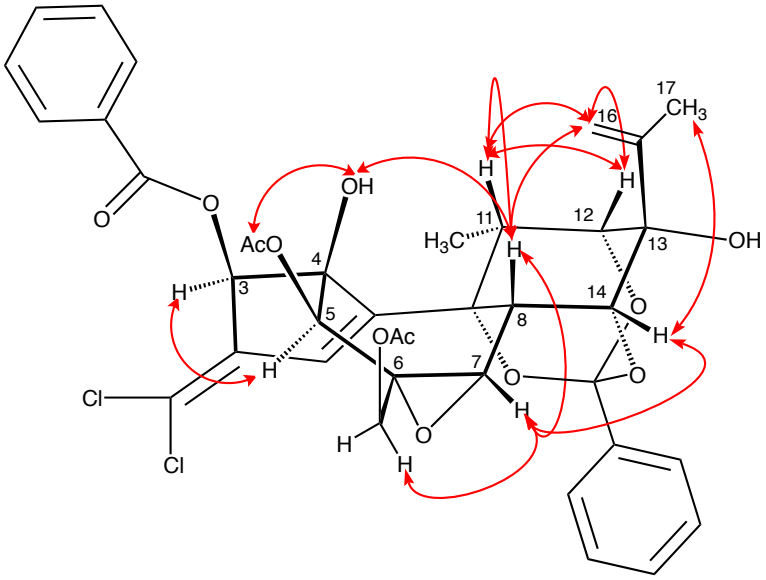
▶ La première est la rigidité de la molécule. Comparée à la chaine latérale phényl-heptenoïque de la chartacéone A (**49**), le squelette diterpénique de la trigocherrine A (**112**) présente beaucoup moins de degrés de liberté. Cette plus grande rigidité conduit à un temps de calcul plus court et à une recherche conformationnelle plus directe.

▶ Le deuxième point est l'apport de données expérimentales telles que les corrélations NOESY ou ROESY. Effectivement, les données issues de la RMN permettent d'introduire des contraintes lors de la recherche conformationnelle qui permettront la sélection de conformères majoritaires en solution, et donc dans les conditions de mesure du DC. Les études hybrides, c'est-à-dire appliquant des méthodes de calcul *ab initio* (non-empiriques) à des conformères sélectionnés via des données expérimentales se sont souvent révélées efficaces.[172]

La grande sensibilité du dichroïsme circulaire montre tout son intérêt dans des cas comme celui-ci ou l'analyse de configuration est menée sur des produits naturels très minoritaires. Ici, 5 µg de trigocherrine A (**112**) sont suffisants pour l'acquisition de la courbe expérimentale de DC.

Précédemment, les corrélations ROESY nous ont permis de définir la stéréochimie relative de la trigocherrine A (**112**) comme étant 3*S**,4*R**,5*R**,6*S**,7*S**,8*S**,9*R**,11*R**,-12*S**,13*S**,14*R**. (Voir page 168 et figure ci-dessous) De façon arbitraire, l'énantiomère 3*S*,4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R* est choisi pour le travail d'analyse conformationnelle. Mille conformères sont générés de manière aléatoire par la méthode Monte Carlo puis minimisés énergétiquement par mécanique moléculaire.

Par la suite, nous utilisons les données issues de la RMN comme contrainte dans un processus de sélection des conformères. Nous « filtrons » les 1000 conformères générés pour retenir uniquement ceux dont les distances inter-atomiques suivantes sont inférieures à 4 Å : H-1/Me-18, H-3/H-5, OH-4/OAc-5, OH-4/H-8, H-7/$H_2$-20, H-7/H-14, H-8/H-11, H-8/$H_2$-16, H-11/H-12, H-11/$H_2$-16, H-12/$H_2$-16 et H-14/Me-17.




Principales corrélations ROESY du composé **112**

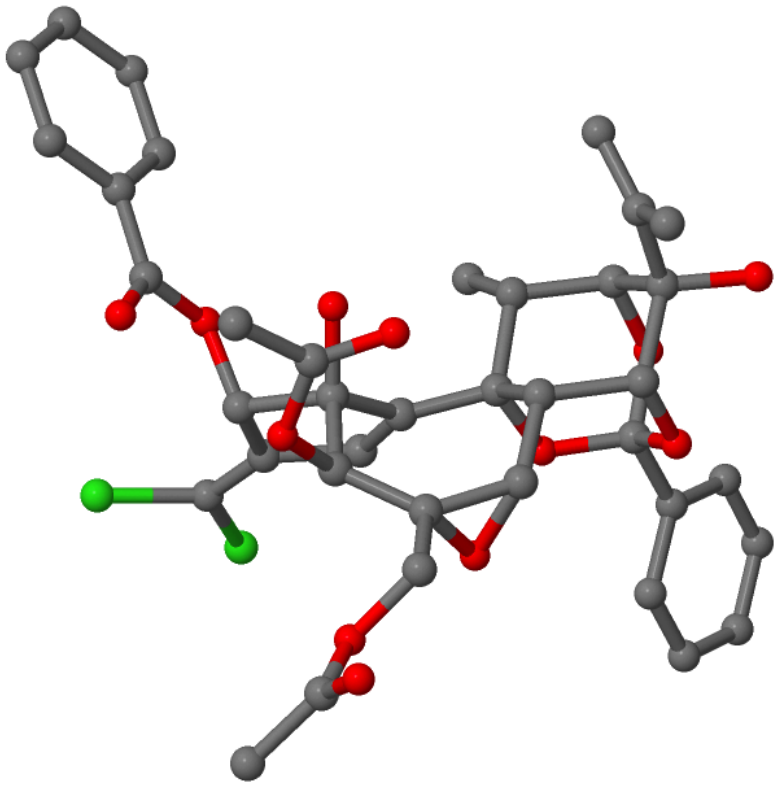


**Figure 175.** Géométrie de la trigocherrine A (**112**) optimisée *ab initio*

La géométrie du conformère de plus basse énergie est optimisée par calcul *ab initio* en employant la méthode TDDFT au niveau B3LYP/6-31G sur le logiciel *Gaussian03*. (Fig. 175) La courbe de DC calculée est mise en regard de la courbe expérimentale (Fig. 176) nous permettant d'attribuer la configuration absolue 3*S*,4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*,11*R*,-12*S*,13*S*,14*R* à la trigocherrine A (**112**).

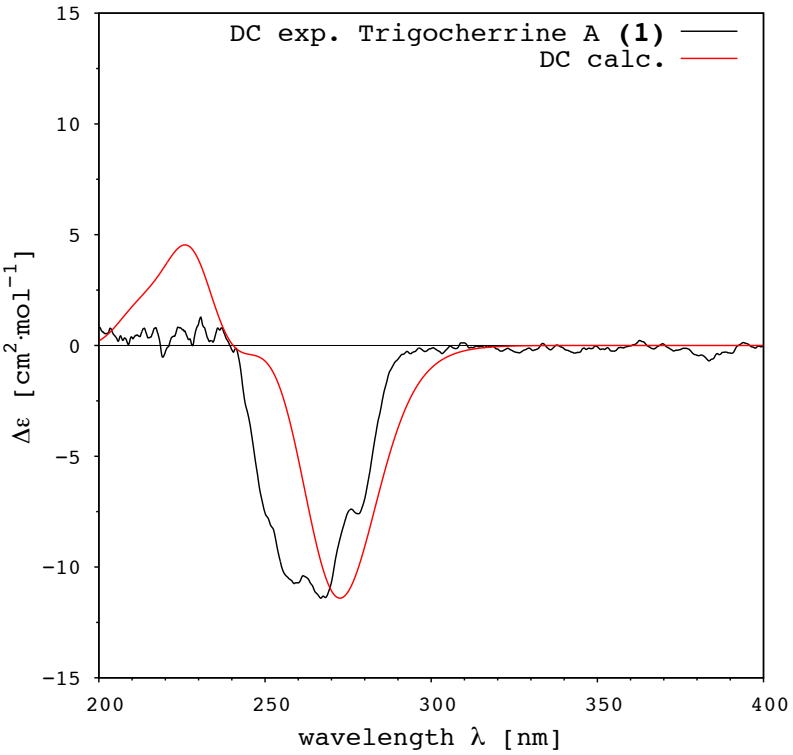



**Figure 176.** Courbe de DC expérimentale de la trigocherrine A (**112**) (en noir) et courbe de DC calculée pour la configuration 3*S*,4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R* de la trigocherrine A (**112**) (en rouge).

## 2.2 Hypothèse biogénétique de formation des DDO halogénés de *Trigonostemon cherrieri*

En premier lieu, il semble important de préciser la nature non-artéfactuelle des DDO halogénés isolés des écorces et du bois de *Trigonostemn cherrieri*. En effet, bon nombre des composés halogénés isolés de végétaux supérieurs sont des chlorohydrines artéfactuelles. Ces chlorohydrines sont souvent isolées avec l'époxide correspondant. Or la fonction époxide, sensible aux acides, peut facilement s'ouvrir et incorporer un anion $Cl^-$ provenant par exemple du chloroforme.[263,275]

Dans notre cas, les solvants employés lors de l'extraction et du fractionnement sont l'hexane, l'AcOEt, le MeOH et l'eau, des solvants non-chlorés. (cf. Partie expérimentale, page 232) De plus, on peut observer les massifs isotopiques [M+2], caractéristiques des composés chlorés, dès la première partition de l'extrait brut AcOEt, dans la fraction polaire. Nous vérifions donc ainsi la nature non-artéfactuelle des DDO halogénés de *T. cherrieri*.

Dans cette section, nous proposons une voie biosynthétique pouvant conduire aux motifs chloro et dichlorovinyliques $\alpha,\beta$-insaturés de ces DDO halogénés. Cette proposition est purement hypothétique et découle de la lecture de travaux actuels concernant les biohalogénases ainsi que de l'observation des métabolites secondaires de type DDO.

Comme décrit dans le chapitre 1.4 de l'étude bibliographie consacré aux composés organohalogénés, plusieurs types de biohalogénases ont été identifiées à ce jour. Leurs caractéristiques sont rappelées dans le tableau ci-dessous.

| **Type d'enzyme** | **Co-facteurs et co-substrats** | **Forme de l'halogène activé** | **Exigences du substrat** |
|---|---|---|---|
| Fe hémique-dépendantes | Hème $H_2O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Vanadium-dépendantes | vanadium, $H_2O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Flavine-dépendante | FADH2, $O_2$ | $X^+$ | aromatique, riche en électrons |
| Fe non-hémique-dépendantes | Fe(II), $O_2$, $\alpha$-cetoglutarate | X• | aliphatique, non-activé |
| Halogénases nucléophiles | | $X^-$ | électrophile, bon groupement partant |

275. Engvild, K. C. *Phytochemistry*, **1986**, *25* 781–791.

L'une de ces enzymes, dite *halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, α-cétoglutarate-dépendante* est capable de mener des halogénations sur des substrats aliphatiques et non-activés. C'est la seule, puisque les autres nécessitent soit un substrat aromatique et riche en électrons soit, dans les cas des fluorinases de *Streptomyces cattleya*, la présence d'un groupement partant comme la S-Adénosyl-Méthionine (SAM).

On peut observer le cycle catalytique supposé d'une halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, α-cétoglutarate-dépendante sur la figure 177, d'après Vaillancourt et al.[276]

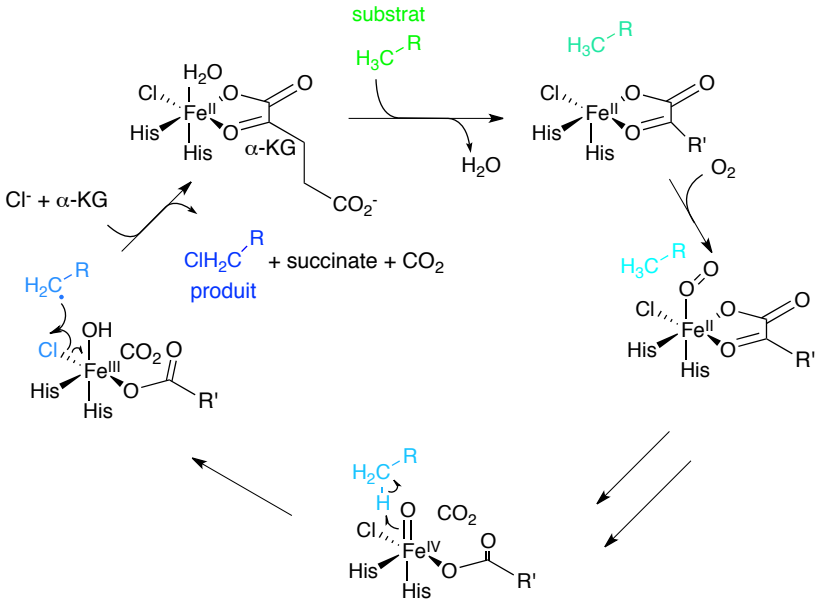



**Figure 177.** Cycle catalytique supposé des halogénases $Fe^{2+}$,$O_2$, α-cétoglutarate-dépendante[276] (α-KG = α-cétoglutarate)

L'étape clé de ce cycle enzymatique est la génération d'une espèce hypervalente feroxo ($Fe^{IV}$=O) qui sera capable d'arracher un atome d'hydrogène lié au carbone du substrat, même si ce dernier n'est pas activé. Si l'attaque porte sur un méthyle, il y a ainsi génération d'une espèce radicalaire de type R-$CH_2$•. Par la suite, le chlore présent dans la sphère de coordination du fer quitte le centre métallique sous forme Cl• et l'addition radicalaire au substrat génère le produit final R-$CH_2$-Cl.

L'implication de cette classe d'enzyme dans la formation du chlorure de vinyle des jamaïcamides, des métabolites isolés de la cyanobactérie marine *Lyngbya majus-*

276. Vaillancourt, F. H. et al. *Chem. Rev.*, **2006**, *106* 3364–78.

*cula*[277], a été mise en évidence.[278] (Fig. 178) L'isomérisation du $\Delta^3$-isopenténylе en $\Delta^2$-isopenténylе génère le $CH_3$ terminal qui sera halogéné par une halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante (*Jam E*). Par la suite, la rétroconversion en isomère $\Delta^3$ génèrerait le chlorure de vinyle rencontré chez les jamaïcamides.[276,278] (Fig. 178)

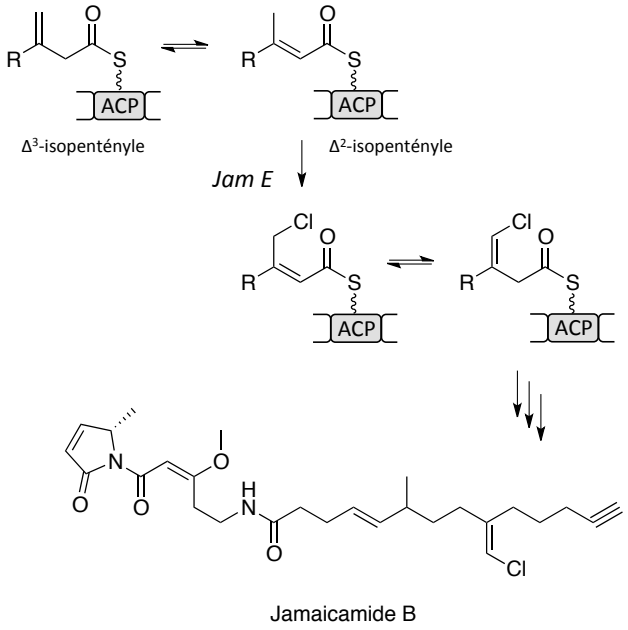



**Figure 178.** Formation du motif chlorovinyle des jamaicamides via *Jam E* (*Jam E* possède un domaine halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante)

Il est également intéressant de noter que ces enzymes sont capables de chlorations séquentielles multiples. C'est par exemple le cas dans la biosynthèse de la L-armentomycine, un produit naturel antibactérien, à partir du L-aminobutyrate.[279] (Fig. 179)

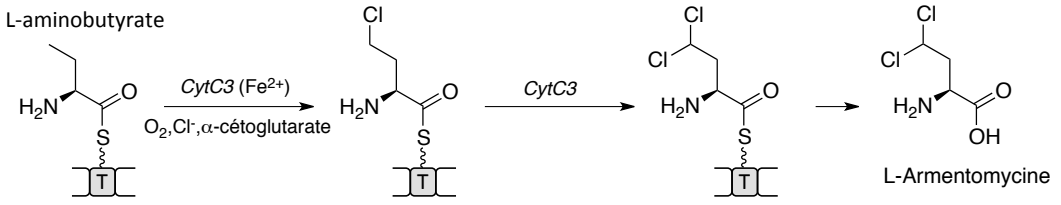



**Figure 179.** Chlorations multiples catalysées par *CytC3*

277. Edwards, D. et al. *Chem. Biol.*, **2004**, *11* 817–833.
278. Gu, L. et al. *Nature*, **2009**, *459* 731–5.
279. Ueki, M. et al. *Chem. Biol.*, **2006**, *13* 1183–91.

Les différents degrés d'oxydation sous lesquels on peut rencontrer le cycle A du squelette daphnane, chez la plus grande partie des DDO connus à ce jour, est présenté figure 180. A l'exception des rédiocides E et F,[216] qui sont les seuls exemples de 2-démèthyl-DDO, on constate systématiquement la présence du méthyle en position 2.

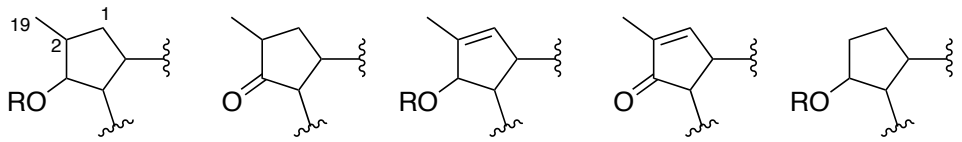



**Figure 180.** Formes du cycle A chez l'ensemble des DDO

Dans le cas des trigocherrines et trigocherriolides, on peut noter que le ou les atomes de chlores sont toujours portés par le même carbone C-19 du squelette diterpénique.

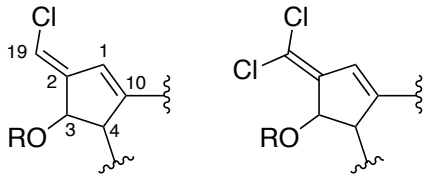



**Figure 181.** Motifs de chloration retrouvés chez les DDO halogénés de *T. cherrieri*

Or il se trouve qu'un DDO non chloré a été isolé de *T. cherrieri*. Ce composé, dont la structure est présentée Fig. 182, a été identifié et caractérisé par Marie-Thérèse Martin, du service de spectroscopie RMN. La structure de ce composé a été résolue dans une fraction de 0,34 mg ($F^{13.19.5}1$ du schéma de fractionnement page 156) où il est en mélange avec un autre composé.

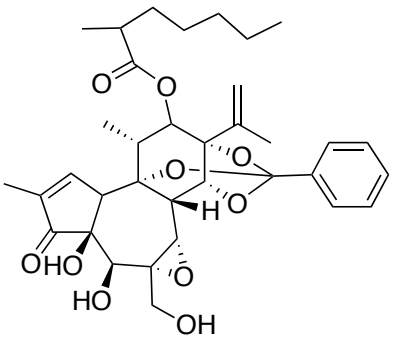



**Figure 182.** DDO non chloré, isolé de l'écorce de *T. cherrieri*

Ensemble, les spécificités de cette halogénase et les caractéristiques structurales des DDO isolés de *T. cherrieri* nous permettent d'envisager l'implication éventuelle de ce type d'enzyme dans la formation du motif chloro ou dicholoro vinylique. Après mono ou dichloration par une halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante sur le carbone aliphatique C-19, une oxydation allylique suivie d'une déshydration pourrait expliquer à la fois la formation du chlorovinyle et de l'insaturation en 1,10. (Mécanisme schématisé sur la figure 183.)

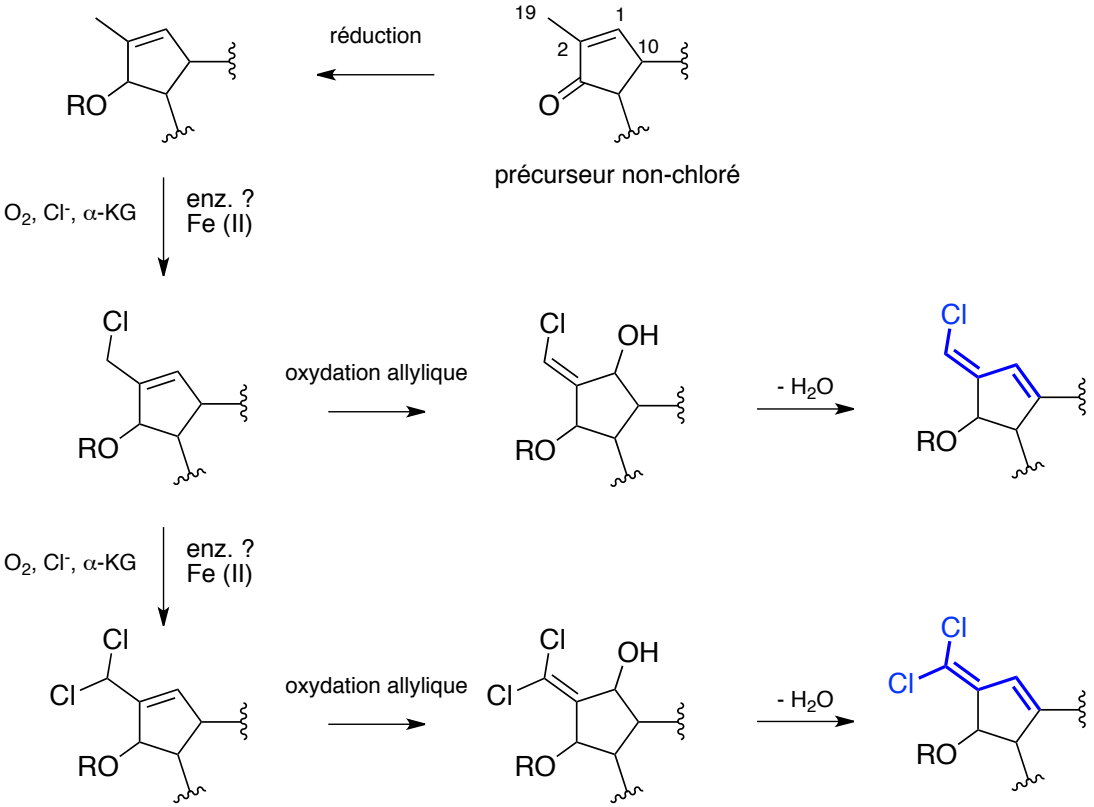



**Figure 183.** Mécanisme hypothétique de formation du motif chloro et dichlorovinyle $\alpha,\beta$-insaturé des DDO halogénés isolés de *T. cherrieri*, impliquant une halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante

Des communications personnelles ont été échangées avec Frédéric Vaillancourt qui a mis en évidence l'existence des halogénases $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendantes[280,281], et David Sherman, spécialiste de la biosynthèse des produits naturels ayant travaillé sur

280. Vaillancourt, F. H. et al. *PNAS*, **2005**, *102* 10111–6.
281. Vaillancourt, F. H. et al. *Nature*, **2005**, *436* 1191–4.

les mécanismes d'halogénation des jamaïcamides.[278] Le premier reste prudent et n'écarte pas d'autres mécanismes d'halogénation possibles, le second semble plus confiant quant à la participation de ce type d'enzyme dans la biosynthèse des DDO de *T. cherrieri*.

La vérification de cette hypothèse impliquerait une étude biochimique approfondie du matériel génétique de *T. cherrieri*. Cette classe d'enzyme n'a pour l'instant été caractérisée que chez des bactéries et il serait tout à fait intéressant de rechercher son existence au sein d'un végétal. On notera que des *oxygénases* $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendantes ont été retrouvées chez des végétaux supérieurs.[282] Il est cependant possible que l'halogénation soit le fait de bactéries présentes dans la plante ou encore que l'halogénation ait lieu plus tôt dans la formation du diterpène.

282. Carolis, E. de ; Luca, V. de *Phytochemistry*, **1994**, *36*.

## 2.3 Activités biologiques

Comme on peut le constater dans le tableau des rendements d'extraction (Tableau 13, page 159), les trigocherrines et les trigocherriolides ont été isolées en très faibles quantités. L'évaluation biologique de l'ensemble des DDO de *T. cherrieri* n'a donc pu être effectuée. D'autre part, à l'heure actuelle, certains des essais antiviraux sont encore en cours, les résultats présentés ici sont, par conséquent, incomplets.

### 2.3.1 Activité biologique sur le virus de la dengue

L'activité inhibitrice vis-à-vis de la NS5 polymérase du DENV des trigocherrines A (**112**) et des trigocherriolides A (**118**) et B (**119**) a été évaluée selon le protocole décrit chapitre 3, page 49.

| **Composé** | **Nom** | **$CI_{50}$ en µM**[a] |
|---|---|---|
| (**112**) | Trigocherrine A | 12,7 ± 0,2 |
| (**118**) | Trigocherriolide A | 2,9 ± 0,2 |
| (**119**) | Trigocherriolide B | 16,0 ± 1,3 |

[a] mesures réalisées en triplicate

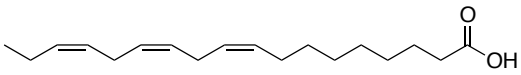
**Tableau 16.** Activité inhibitrice de la NS5 polymérase du DENV de la trigocherrine A (**112**) et des trigocherriolides A (**118**) et B (**119**)

### 2.3.2 Activité biologique sur le virus du chikungunya

La découverte de l'activité antivirale des trigocherrines vis-à-vis du CHIKV est ce que l'on peut appeler une sérendipité. Dans le cadre de sa thèse portant sur la recherche d'inhibiteurs du CHIKV issus de la biodiversité malgache, Mélanie Bourjot, doctorante au sein du laboratoire, a travaillé sur une plante de la famille des Salicaceae : *Flacourtia ramontchi*. L'analyse structurale d'une fraction active indiquant la présence de métabolites de type acide gras poly-insaturé, elle a choisi d'évaluer l'activité d'autres composés structuralement apparentés. Plusieurs acide gras isolés de différentes plantes travaillées au laboratoire ainsi que six acides gras commerciaux (acide myristique, acide linoléique, acide palmitique, acide arachidonique, acide oléique et acide *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque) ont été évalués dans un essai biologique visant à détecter une activité antivirale *in cellulo* vis-à-vis du CHIKV. Parmi les acide gras

évalués l'un d'entre eux, isolé de *Trigonostemon cherrieri* présentait une forte activité anti-virale apparente avec une $CE_{50}$ de 2,25 µg mL$^{-1}$, une cytotoxicité de 18,6 µg mL$^{-1}$ et des observations microscopiques suggérant un mécanisme antiviral spécifique. Les autres acide gras n'inhibent pas ou peu le CHIKV *in cellulo*.

L'acide gras en question correspond en fait à la fraction **F$^{13}$16** du schéma d'extraction 143, page 156. L'analyse RMN permet d'identifier le produit comme étant l'acide *cis*-$\Delta^{9,12,15}$-octadécatriènoïque (**123**) encore appelé acide $\alpha$-linolénique, un acide gras poly-insaturé de la classe des $\omega$-3.




Acide $\alpha$-linolénique (**123**)

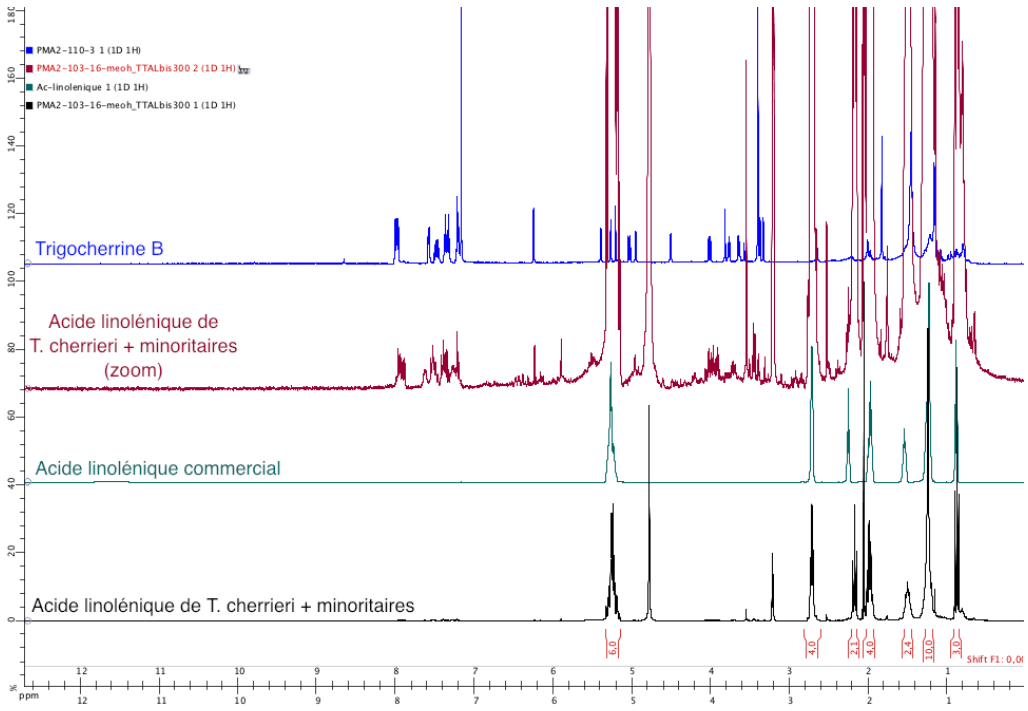



**Figure 185.** Superposition des spectres $^1$H de l'acide $\alpha$-linolénique isolé de *Trigonostemon cherrieri* (en noir), de l'acide $\alpha$-linolénique commercial (en vert), d'un agrandissement du spectre de l'acide $\alpha$-linolénique de *T. cherrieri* permettant de voir les composés minoritaires (en rouge) et de la trigocherrine B (**113**) (en bleu).

L'analyse du spectre RMN $^{1}$H a montré, cependant, la présence de composés minoritaires dans la fraction à hauteur de 2 % environ (évalué par les intégration sur le spectre $^{1}$H voir Fig. 185). Parmi les composés minoritaires présents dans la fraction $\mathbf{F}^{13}\mathbf{16}$, il semble que l'on puisse reconnaître des signaux caractéristiques des trigocherrines portant deux fonctions benzoates. Sur la figure 185, on a superposé le spectre de la trigocherrine B (**113**) aux spectres de la fraction $\mathbf{F}^{13}\mathbf{16}$ et de l'acide $\alpha$-linolénique commercial.

► ***Hypothèse :*** *le ou les composés minoritaires présents au sein de la fraction* $\mathbf{F}^{13}\mathbf{16}$ *seraient responsables de l'activité antivirale observée.*

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'activité antivirale de l'acide $\alpha$-linolénique commercial. Celui-ci s'est montré inactif, confirmant ainsi le rôle des composés minoritaires de la fraction $\mathbf{F}^{13}\mathbf{16}$ dans l'activité antivirale de celle-ci. L'analogie observée entre les spectres $^{1}$H des composés minoritaires de la fraction $\mathbf{F}^{13}\mathbf{16}$ et les trigocherrines laisse penser que ces dernières sont porteuses de l'activité antivirale.

Par la suite nous avons donc évalué l'activité antivirale de la fraction polaire issue du partitionnement de l'extrait AcOEt des écorces ainsi que des fractions issues du fractionnement des extraits AcOEt d'écorces et de bois de *T. cherrieri*. Toutes les fractions ayant conduit à l'isolement de trigocherrines se sont montrées actives sur CHIKV. Voir les schémas de fractionnement, figures 143, 144 et 145, pages 156-158. L'évaluation de trois trigocherrines (**112**,**113** et **117**) et trois trigocherriolides (**118-120**) purs confirme que ces molécules sont bien responsables de l'activité antivirale détectée précédemment. Voir tableau 17.

Les $CE_{50}$ obtenues pour DDO de *T. cherrieri* sont comprises entre 1,0 et 4,7 µM. Elles sont proches les unes des autres et il est difficile de déterminer des RSA pour ce qui est de l'activité inhibitrice de la croissance du virus. Lors de l'essai biologique *in cellulo*, il est nécessaire de déterminer une $CC_{50}$ [a] afin de s'assurer que l'activité antivirale observée n'est pas accompagnée d'une toxicité cellulaire. Le rapport entre la $CC_{50}$ et la $CE_{50}$ donne l'indice de sélectivité (IS). Un IS élevé témoigne d'une activité antivirale exercée sans toxicité pour les cellules infectées. L'analyse des données du tableau 17 indique que les trigocherrines présentent un IS nettement plus élevé que les trigocherriolides. Il semblerait donc que la macrolactone soit associée à une plus forte toxicité des produits sur les cellules infectées.

a. concentration à laquelle s'exerce 50 % de la cytotoxicité

| Composé | Nom | $CE_{50}$ (µM) | $CC_{50}$ (µM) | IS |
|---|---|---|---|---|
| (**112**)[a] | Trigocherrine A | $< 193$ | $> 105$ | $> 105$ |
| (**113**)[b] | Trigocherrine B | $2{,}3 \pm 0{,}3$ | $93 \pm 3$ | 40,4 |
| (**117**)[b] | Trigocherrine F | $2{,}4 \pm 0{,}4$ | $23{,}1 \pm 0{,}5$ | 9,6 |
| (**118**)[c] | Trigocherriolide A | $1{,}9 \pm 0{,}6$ | $4{,}6 \pm 0{,}8$ | 2,4 |
| (**119**)[d] | Trigocherriolide B | $2{,}3 \pm 0{,}3$ | $5{,}3 \pm 0{,}2$ | 2,3 |
| (**120**)[b] | Trigocherriolide C | $4{,}4 \pm 0{,}3$ | $10{,}3 \pm 0{,}2$ | 2,3 |
| | Chloroquine[e] | 4,2 | 88,4 | 21,1 |

[a] mesures non répétées
[b] moyennes de 2 mesures
[c] moyennes de 10 mesures
[d] moyennes de 4 mesures
[e] inhibiteur de référence lors du test sur CHIKV *in cellulo*

**Tableau 17.** Activité inhibitrice des trigocherrines et trigocherriolides sur le CHIKV *in cellulo*

Les activités antivirales observées pour les DDO de *T. cherrieri* sont intéressantes. En effet, ces composés sont, jusqu'à présent, les meilleurs inhibiteurs du CHIKV *in cellulo* et sont plus actifs que la chloroquine, employée comme référence dans cet essai. Un indice de sélectivité important est observé pour les trigocherrines A (**112**) et B (**113**). Il témoigne d'un mécanisme antiviral qui s'exerce sans toxicité pour les cellules traitées. Pour élucider le mécanisme de l'activité antivirale de ces produits, il est nécessaire de procéder à d'autre essais biologiques. Les essais d'addition dans le temps permettent, par exemple, de déterminer la phase du cycle de la réplication virale au cours de laquelle s'exerce l'activité : entrée du virus dans la cellule, traduction du matériel génétique viral, assemblage du virus, réplication ... Cependant, des quantités plus importantes de produits sont nécessaires à la réalisation de ces essais. Actuellement, Mélanie Bourjot travaille une autre espèce du genre, *Trigonostemon gagnepainianus* ainsi que les feuilles de *Trigonostemon cherrieri* dans le but d'obtenir d'autres DDO et des quantités plus importantes de trigocherrines et de trigocherriolides.

## Perspectives

Au vu de la très puissante activité de la gnidimacrine (**84**) et des stelleralides sur le VIH *in cellulo* (voir page 139 de l'étude bibliographique), et de la proximité structurale de ces composés avec les trigocherriolides, il serait tout à fait pertinent d'évaluer

l'activité inhibitrice de ces derniers vis-à-vis du VIH.

L'activité anti-infectieuse de la gnidimacrine s'exerce en partie par la répression des récepteurs cellulaires CCR5 et l'internalisation partielle des récepteurs CD4 et CXCR4. Cette répression est la conséquence de l'activation des protéines kinases C-$\beta$.[255] Les études du mécanisme anti-VIH de diterpènes comme la gnidimacrine et la prostratine sont nombreuses et pourraient donner des pistes quant au mécanisme de l'activité observée sur le CHIKV.

# Conclusion de la Partie III

La sélection de *Trigonostemon cherrieri* pour son étude phytochimique s'est effectuée sur la base de plusieurs critères. Premièrement, l'extrait brut AcOEt des écorces de la plante présentait une inhibition de la NS polymérase du DENV de 76 % à 10 µg mL$^{-1}$. Bien qu'elle ne fasse pas partie des meilleurs candidats de notre criblage de confirmation, cette plante fait partie des espèces les plus actives sur 650 espèces criblées. (Voir tableau 1, page 50) Cependant, c'est plus la situation taxonomique de la plante en Nouvelle-Calédonie ainsi que l'intérêt structural des métabolites précédemment isolés du genre qui nous ont conduit vers ce choix.

Après une partition Heptane/MeOH de l'extrait AcOEt des écorces , un premier fractionnement est effectué et l'activité des fractions fut évaluée sur la NS5 polymérase du DENV. L'élucidation structurale de la trigocherrine A (**112**), isolée d'une des fractions actives, nous a permis d'établir son squelette comme étant un DDO. La spectrométrie de masse à haute résolution et la RMN ont indiqué la présence d'un motif dichlorovinylique $\alpha,\beta$-insaturé au niveau du cycle A.

Par la suite, et dans le but d'isoler des analogues de la trigocherrine, ce seront des caractéristiques structurales comme le massif isotopique [M+2] des produits chlorés et les singulets observés sur le spectre $^1$H de la trigocherrine A (**112**) qui guideront le fractionnement.

Ce fractionnement, que l'on peut donc qualifié de *RMN/LCMS-guidé*, nous a permis de caractériser un total de 10 composés nouveaux appartenant tous à la même famille. Nous avons donné le nom de « trigocherrines » aux composés présentant un squelette de type DDO et celui de « trigocherriolides » aux DDOM possédant un cycle macrolactonique. Ces daphnanes de *T. cherrieri* ont été isolés en quantité très limitée. Leur élucidation structurale a été rendu possible par l'emploi de la RMN dite *capillaire* qui a permis l'acquisition de spectres RMN 2D (HSQC,HMBC,ROESY) à partir de 0,19

mg de produit. Les compétences de Marie-Thérèse Martin, spectroscopiste à l'ICSN ont été déterminantes dans l'étude de cette série de composés. La configuration absolue de la trigocherrine A (**112**) a été établie par comparaison des spectres de dichroïsme circulaire calculés et expérimentaux.

L'origine biosynthétique du motif chlorovinylique des trigocherrines et des trigocherriolides est incertaine. Les données bibliographiques concernant les enzymes capables de biohalogénation et la structure des daphnanes de *T. cherrieri* nous conduisent à proposer l'implication d'une halogénase $Fe^{2+}$,$O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante. Des expériences de biologie moléculaire visant la recherche de séquences caractéristiques de ces halogénases dans l'ADN total de la plante permettraient la vérification de cette hypothèse.

L'activité antivirale observée sur l'extrait brut peut-être vraisemblablement attribuée aux trigocherrines et aux trigocherriolides. Trois de ces composés ont été évalués sur la NS5 polymérase du DENV avec des $CI_{50}$ comprises entre 2,9 et 16,0 µM. Par ailleurs, la découverte fortuite de leur activité sur le CHIKV, nous a amené à évaluer 6 de ces produits sur ce virus, *in cellulo*. Les $EC_{50}$, comprises entre 1 et 4,7 µM, sont globalement équivalentes pour tous les composés évalués. On peut cependant noter un indice de sélectivité nettement plus élevé pour les trigocherrines comparées aux trigocherriolides, leurs analogues macrolactoniques. Là encore, la compréhension du mécanisme antiviral de ces molécules nécessiterait des études plus approfondies.

# Conclusion générale

Ces travaux de thèse font suite à une collaboration établie entre le pôle PSN-plantes de l'ICSN, à Gif-sur-Yvette, et l'équipe de biologie structurale de l'AFMB, à Marseille. L'objectif premier de cette collaboration était la mise en évidence d'inhibiteurs de la NS5 polymérase du virus de la dengue au sein de la biodiversité néo-calédonienne. Un criblage initial a ainsi été réalisé sur plus de 1350 extraits provenant de 650 plantes néo-calédoniennes envers la polymérase du DENV. Lors d'un second criblage de confirmation, une quinzaine d'espèces présentent un pourcentage d'inhibition supérieur à 80 % à $10\,\mu g\,mL^{-1}$.

Parmi ces 15 espèces, la présence de trois *Cryptocarya* nous a incité à sélectionner ce genre pour son étude phytochimique. L'étude de *Cryptocarya chartacea* a conduit à l'isolement de 6 nouveaux composés appartenant à une même série chimique. Les chartacéones A-F (**49-54**) sont des flavanones 6-mono et 6,8-dialkylées. Toutes les chartacéones ont été isolées sous forme de mélange racémique. Les chartacéones 6-monoalkylées A et B (**49** et **50**) ont été purifiées sur colonne chirale pour obtenir, dans chaque cas, les quatre diastéréoisomères optiquement purs A1-A4 (**55-58**) et B1-B4 (**59-62**), respectivement. Une étude configurationnelle a été menée sur les chartacéones A1-A4 (**55-58**) et a permis la détermination de leur configuration absolue par comparaison des spectres de dichroïsme circulaire calculés et expérimentaux. Le potentiel d'inhibition de l'ensemble des chartacéones isolées a été évalué vis-à-vis de plusieurs ARN polymérases virales. Les chartacéones inhibent de façon sélective les polymérases du genre *Flavivirus* (DENV et WNV). Au sein de la série, les chartacéones bi-substituées C-F (**51-54**) présentent le meilleur potentiel d'inhibition avec des $CI_{50}$ comprises entre 1,8 et 4,2 µM sur la NS5 polymérase du DENV. Les chartacéones ne sont pas cytotoxiques sur lignées cellulaires cancéreuses (KB) et saines (MRC5) à $10\,\mu g\,mL^{-1}$.

Bien que l'extrait brut de la seconde plante ne soit pas dans les 15 meilleurs candidats lors du criblage initial, *Trigonostemon cherrieri* a été sélectionné en raison de son intérêt chimiotaxonomique, étant le seul représentant du genre en Nouvelle-Calédonie et de l'originalité du squelette carboné de bon nombre de molécules isolées de ce genre. Les travaux phytochimiques menés sur cette espèce ont permis l'isolement d'une série de diterpénoïdes daphnanes orthoesters halogénés simples (les trigocherrines A-F (**112-117**)) ou macrolactoniques (les trigocherriolides A-D (**118-121**)). L'isolement des trigocherrines et des trigocherriolides s'est fait à partir d'un fractionnement guidé par

des critères biologiques et structuraux. L'utilisation du spectromètre RMN 600 MHz équipé d'une microsonde a été déterminante pour l'élucidation structurale de ces métabolites isolés en quantité limitée. Les propriétés antivirales des trigocherrines et des trigocherriolides ont été clairement établies. Vis-à-vis de la NS5 polymérase du DENV, seules la trigocherrine A (**112**) et les trigocherriolides A et B (**118** et **119**)) ont été évalués, ces composés présentent des $CI_{50}$ comprises entre 2,9 ± 0,2 et 16,0 ± 1,3 µM. D'autre part, le potentiel antiviral de *Trigonostemon cherrieri* vis-à-vis du virus du Chikungunya a été mis en évidence de manière fortuite par une doctorante du laboratoire. Par la suite, l'évaluation biologique des DDO halogénés de *T. cherrieri* indique que ces métabolites sont vraisemblablement responsables de l'activité antivirale observée. Les trigocherrines A (**112**), B (**113**) et F (**117**) et les trigocherriolides A-C (**118-120**) ont été évalués. Ils présentent des $CE_{50}$ comprises entre 1 et 4,7 µM sur CHIKV *in cellulo*, avec des IS allant de 2 à plus de 65. Ces composés représentent les meilleurs inhibiteurs du CHIKV connus à ce jour.

Ensemble, ces résultats permettent de valider une approche collaborative développée entre l'ICSN pour la partie phytochimique et ses partenaires à Marseille et Louvain pour le criblage et l'évaluation biologique des composés isolés. L'activité antivirale détectée sur les extraits bruts des plantes étudiées pendant ma thèse est confirmée et attribuée aux métabolites secondaires isolés.

Les chartacéones de *C. chartacea*, présentes en quantité appréciable au sein des écorces, inhibent la NS5 polymérase du DENV à des concentrations non-cytotoxiques. L'étude approfondie du mécanisme d'action antiviral des ces produits est en cours à Marseille.

Les trigocherrines et les trigocherriolides de *T. cherrieri* sont des molécules intéressantes pour plusieurs raisons. Du point de vue chimique, ces métabolites permettent d'illustrer la complexité structurale des produits naturels. En effet des molécules comme le trigocherriolide A, halogénée, macrolactonique, présentant plus de 100 atomes et 15 centres stéréogènes peuvent être une source d'inspiration et un véritable défi pour le chimiste de synthèse. La caractérisation des ces DDO halogénés valide notre sélection initiale, basée sur des critères chimiotaxonomiques, qui visait l'isolement de structures originales. Du point de vue biogénétique, la présence du motif chloro ou dichlorovinyle pourrait être expliquée par une chloration radicalaire catalysée par une halogénase Fe

non-hémique, $O_2$, $\alpha$-cétoglutarate-dépendante. Ces enzymes, récemment découvertes, n'ont pour l'instant été caractérisées que chez des bactéries. L'étude biochimique approfondie du matériel génétique de *T. cherrieri* serait d'un grand intérêt et permettrait l'éventuelle caractérisation d'une halogénase. Du point de vue biologique, ces molécules sont remarquables pour leurs propriétés antivirales vis-à-vis du CHIKV. Ensemble, les caractéristiques chimiques et les propriétés biologiques des métabolites isolés de *Trigonostemon cherrieri* justifient l'étude de cette espèce endémique menacée et seront, espérons-le, un motif supplémentaire de conservation et de protection.

Personnellement, les trois ans de cette thèse furent un apprentissage continu. De façon particulière, l'étude de la stéréochimie des chartacéones fut l'occasion de me familiariser avec le dichroïsme circulaire, une technique chiroptique d'un grand intérêt, en particulier dans le domaine des substances naturelles. La collaboration étroite établie avec Marie-Elise Tran Huu Dau du service de modélisation moléculaire a permis de réaliser, pour la première fois à l'ICSN, une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de DC. Avec le temps et l'expérience, cette méthode d'étude de la stéréochimie des molécules pourra être appliquée de façon plus routinière dans des cas de figures fréquemment rencontrés lors de l'étude des substances naturelles : absence de cristaux, absence de référence, quantités disponibles limitées ... De manière plus générale, l'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse m'ont fait prendre conscience du caractère indispensable de l'interdisciplinarité et, plus généralement, de l'importance de la communication et de l'échange lors des travaux de recherche. Que ce soit à l'échelle de l'équipe, de l'unité de recherche et plus largement entre équipes évoluant dans des domaines distincts, l'échange est nécessaire. Des regards et perceptions différents sont la clef d'une vision globale et pertinente de la problématique de recherche.

## Quatrième partie

# Partie Expérimentale

# Chapitre 1

# Procédures générales

## 1.1 Solvants et réactifs

Des solvants (SDS) de pureté 99 % ont été utilisés pour les extractions et les premiers fractionnements, puis des solvants de qualité HPLC ou 100 % (SDS) pour les séparations ultérieures. L'eau employée lors des séparations CLHP est de l'eau milliQ re-filtrée le jour de la manipulation au laboratoire avec l'appareil Millipore® Simplicity 185.

## 1.2 Fractionnements, purifications et suivi des réactions

### 1.2.1 Chromatographie sur couches mince

Les fractions issues des différentes séparations chromatographiques et les réactions ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice 60 F254 de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium (SDS) ou gel RP-18 UV254 (Macherey-Nagel). Les plaques ont été visualisées dans un premier temps sous UV (à 254 et 366 nm) avant d'être révélées par pulvérisation d'un révélateur puis chauffage. Deux révélateurs ont principalement été employés :

- Réactif à l'acide sulfomolybdique (10 g de molybdate d'ammonium dans 900 mL d'eau + 100 mL d'acide sulfurique)
- Réactif à la vanilline (10 g de vanilline sans 1 L de EtOH + 20 mL d'acide sulfurique)

### 1.2.2 Chromatographie sur colonne (CC)

Les séparations chromatographiques sur colonne (CC) ont été effectuées à moyenne ou haute pression. Les CC ont été réalisées soit dans des colonnes en verre de différents diamètres en utilisant de la silice de granulométrie fine (6-35 µm) ou moyenne (35-70 µm) (SDS) où l'éluant est poussé par de l'air comprimé ( 3 bar), soit à l'aide d'un appareil Combiflash-Companion® (Serlabo) en utilisant des colonnes prépackées en phase inverse $C_{18}$ (Versapack® Cartridge, 140 g, 40 × 150 mm, 45-75 µm) ou en phase normale (colonne de gel de silice : Silicycle® 15-40 µm 4 g, Redisep® 15-60 µm 4 et 12 g, Redisep® 35-70 µm 12 et 40 g, ou Versapack® 102 g, 40 × 150 mm, 45-75 µm). Les échantillons ont été injectés par dépôt solide en les adsorbant sur de la célite (Clarcel, SDS).

### 1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

#### 1.2.3.1 CLHP en phase inverse

Les chromatographies haute performance (CLHP) en phase inverse, analytiques et préparatives ont été réalisées sur 3 appareils :

• Une chaîne Alliance Waters 2695 et une chaîne Waters *autopurification system* (Waters 2767 Sample Manager) équipée d'une pompe binaire (Waters 2525). Ces deux appareils sont munis d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) et d'un détecteur à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratorie PL-ELS 1000), et sont contrôlés par le logiciel MassLynx.

• Une chaîne Dionex, équipée de deux pompes Dionex P580, d'un injecteur Gilson 215, d'un détecteur à barrettes de diode UV (MSV6) et à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratorie PL-ELS 1000). L'appareil est contrôlé par le logiciel Chromeleon.

Les produits ont été élués avec des mélanges $H_2O$/ACN ou $H_2O$/MeOH en utilisant plusieurs types de colonnes:

• Colonnes $C_{18}$ Thermohypersil Kromasil® analytique (5 µm, 4,6 × 250 mm), semi-préparative (5 µm, 10 × 250 mm) et préparative (5 µm, 21,2 × 250 mm)

• Colonnes $C_{18}$ Symetry Shield® analytique (5 µm, 4,6 × 150 mm), semi-préparative (7 µm, 10 × 250 mm) et préparative (5 µm, 19 × 150 mm)

• Colonnes Sunfire® analytique (5 µm, 4,6 × 250 mm) et préparative (10 µm, 19 × 150 mm).

#### 1.2.3.2 CLHP-MS

Les analyses CLHP-MS ont été réalisées sur un appareil ThermoFinnigan, équipé d'une pompe Surveyor MS et d'un analyseur de masse à trappe d'ion avec une interface ESI ou APCI. L'appareil est contrôlé par le logiciel Xcalibur.

#### 1.2.3.3 CLHP chirale

Les séparations des énantiomères par CLHP chirale ont été réalisées en utilisant un appareil Waters Alliance 2695 équipé d'un détecteur à barrette de diode UV-vis (190-600 nm, Waters 2996), et contrôlé par les logiciels Enpower.

• Colonnes AD-H analytique (5 µm, 4,6 × 150 mm) et AD semi-préparative (10 µm, 10 × 250 mm) et OD, IA et IC analytiques (5 µm, 4,6 × 150 mm).

#### 1.2.3.4 SFC

Le mélange de chartacéone D et E a été séparé par chromatographie Super Critique (SFC) en utilisant l'appareil Thar® SFC, muni d'un four Analytical-2-prep Oven, d'une pompe à 4 voies, d'un collecteur et de deux détecteurs : détecteurs Waters 2998 (Photodiode array) et 2424 (ELS). Il est contrôlé par le logiciel SuperChrom.

• Colonne 2-éthyl-pyridine (5 µm, 10 × 250 mm) Princeton®.

## 1.3 Analyses physiques et spectrales des composés

### 1.3.1 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Jasco P1010 (logiciel Spectro Manager) ou d'un polarimètre Anton Paar MCP200. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium. Les expériences ont été réalisées avec une cuve de 10 cm ou 1 cm et les composés solubilisés dans le méthanol ou le chloroforme.

### 1.3.2 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-810 (logiciel Spectro Manager). Les expériences ont été réalisées dans le méthanol ou le chloroforme dans une cuve en quartz de 1 cm, à température ambiante.

### 1.3.3 Spectrométrie ultra-violet (UV)

Les spectres d'absorption UV ont été mesurés dans une cuve en quartz de 1 cm, avec un spectromètre Varian Cary 100 Scan équipé du logiciel CaryWing (programme Scan). Les composés ont été solubilisés dans le méthanol ou le chloroforme.

### 1.3.4 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse haute résolution ESI (Electro Spray Ionisation) ont été réalisés sur un spectromètre à trappe d'ion Thermoquest TLM LCQ en bypass. Soit en UPLC-MS, chaîne UPLC (Acquity, Waters) (colonne BEH $C_{18}$, 1.0 × 50 mm, 1.7 µm) couplée à un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT Premier XE) et à un détecteur UV PDA (Acquity, Waters).

### 1.3.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

**Tableau 18.** Références utilisées pour les déplacements chimiques

| **Solvant** | $\delta_C$ (ppm) (multiplicité) | $\delta_H$ (ppm) (multiplicité) |
|---|---|---|
| $CDCl_3$ | 77.23 (3) | 7.24 (1) |
| $CD_3OD$ | 49.15 (7) | 4.78 (1) |
| | | 3.31 (5) |
| DMF-$d_7$ | 163.15 (3) | 8.03 (1) |
| | 34.89 (7) | 2.92 (5) |
| | 29.76 (7) | 2.75 (5) |

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur des appareils Brüker Avance 300, 500 ou 600 MHz en utilisant le chloroforme-$d$, le méthanol-$d_4$ ou le N,N-diméthylformamide-$d_7$ (SDS) comme solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au solvant pris comme référence interne. Les valeurs des $\delta$ des solvants sont celles publiées par Cambridge Isotope Laboratories, Inc. et rapportées dans le tableau 18. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet), qt (quintuplet) et br pour large (*broad*). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D $^1$H, $^{13}$C et DEPT-135, associées

aux expériences 2D $^{1}$H-$^{1}$H COSY, $^{1}$H-$^{13}$C HSQC ou HMQC, $^{1}$H-$^{13}$C HMBC et $^{1}$H-$^{1}$H NOESY ou ROESY, en utilisant les logiciels NoteBook ou TopSpin.

## 1.4 Calculs théoriques et génération des courbes de DC

Les conformères sont générés par la méthode de recherche aléatoire Monte-Carlo.[182] L'optimisation de la géométrie des conformères se fait par mécanique moléculaire avec la méthode Polak-Ribière Conjugated Gradient (PRCG)[183] et le champ de force OPLSA*[283] dans le chloroforme (chartacéones) ou par la méthode Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG)[284] et le champ de force MM2[285] (trigocherrines). Les calculs de mécanique moléculaire se font sur le logiciel MacroModel (V 5.5).[286] Les calculs de mécanique quantique menés sur les conformères sélectionnés se font par la méthode TDDFT au niveau B3LYP/6-31G(d,p).[177,178] Ces calculs sont effectués sur le logiciel *Gaussian03*.[184]

La pondération de Boltzmann[185] (pour les chartacéones) et la génération des courbes de DC se font sur le logiciel SpecDis (V 1.51).[287]

283. Jorgensen, W. L. ; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110* 1657–1666.
284. Ponder, J. W. ; Richards, F. M. *J. Comput. Chem*, **1987**, *8* 1016–1024.
285. Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99* 8127–8134.
286. Mohamadi, F. et al. *J. Comput. Chem.*, **1990**, *11* 440–467.
287. Bruhn, T. et al., *SpecDis* ; University Würzburg : Würzburg : 2011.

# Chapitre 2

# Extractions et purifications

## 2.1 *Cryptocarya chartacea* Kosterm.

L'écorce de tronc broyée et séchée (495 g) de *Cryptocarya chartacea* Kosterm. (récolte LIT-0528) a été extraite par l'AcOEt (3×1,5 L) suivie par MeOH (3×1,5 L) à température ambiante. Six grammes d'extrait acétate d'éthyle ($\rho$ = 1,2% p/p) et 34.7 g ($\rho$ = 7%p/p) d'extrait méthanolique ont été obtenus.

Les 6 g de l'extrait AcOEt ont été soumis à une chromatographie Flash en phase inverse en utilisant un gradient MeOH:$H_2O$:AcOEt (80:20:0 à 00:50:50) de polarité décroissante, conduisant à 12 fractions.

La fraction **F6** (100 mg; $H_2O$:MeOH, 30:70) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur une phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (50:50) à 15 mL $min^{-1}$ pour donner la pinocembrine (**48**) (17,8 mg).

La fraction **F8** (2,12 g; $H_2O$:MeOH, 10:90) a été soumise à une CC sur gel de silice éluée par un gradient de $CH_2CI_2$:MeOH (100:0 à 80:20) de polarité croissante, conduisant à 17 fractions (**F1′-F17′**), qui ont été regroupées sur la base de leurs profils CCM.

La fraction **F10′** (300 mg; $CH_2CI_2$:MeOH, 99:1) a été soumise à une CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil®, en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (24:76 + 0,1 % d'acide formique) à 14 mL $min^{-1}$ pour obtenir la pinocembrine (**48**) (4,7 mg), la chartacéone A (**49**) (139,1 mg) et la chartacéone B (**50**) (48,1 mg).

La fraction **F11′** (370 mg; $CH_2CI_2$:MeOH, 98:2) a été soumise à une CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:MeCN (20:80 + 0,1%

d'acide formique) à 21 $mL\,min^{-1}$ pour conduire à l'obtention de chartacéone A (**49**) (30,9 mg), de la chartacéone C (**51**) (48,1 mg), d'un mélange de chartacéones D (**52**) et E (**53**) (104,6 mg) et de la chartacéone F (**54**) (86,9 mg).

***Séparation des isomères de position, chartacéone D (52) et E (52) :*** Le mélange de chartacéones D (**52**) et E (**53**) (38 mg) a été soumis à une séparation chromatographique semi-préparative en phase supercritique (SFC) sur une phase stationnaire 2-éthyl-pyridine Princeton® en utilisant un isocratique $CO_2$:MeOH (70:30) à 10 $mL\,min^{-1}$, 39,9 °C, pour donner la chartacéone D (**52**) (8,2 mg) et la chartacéone E (**53**) (9,7 mg).

***Séparation des diastéréoisomères, chartacéones A1-A4 (55-58) et B1-B4 (59-62):*** La chartacéone A (**49**) (85 mg) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur colonne chirale Chiralpak® AD en utilisant un isocratique *n*-heptanes:EtOH (70:30+ 0,1% d'acide formique) pour obtenir les chartacéones A1 (**55**) (18,9 mg), A2 (**56**) (21,7 mg), A3 (**57**) (19,2 mg) et A4 (**58**) (20,5 mg). Dans les mêmes conditions, la chartacéone B (**50**) (44,9 mg) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur une colonne chirale pour donner les chartacéones B1 (**62**) (10 mg), B2 (**62**) (7,9 mg) , B3 (**62**) (11 mg) et B4 (**62**) (7,8 mg).

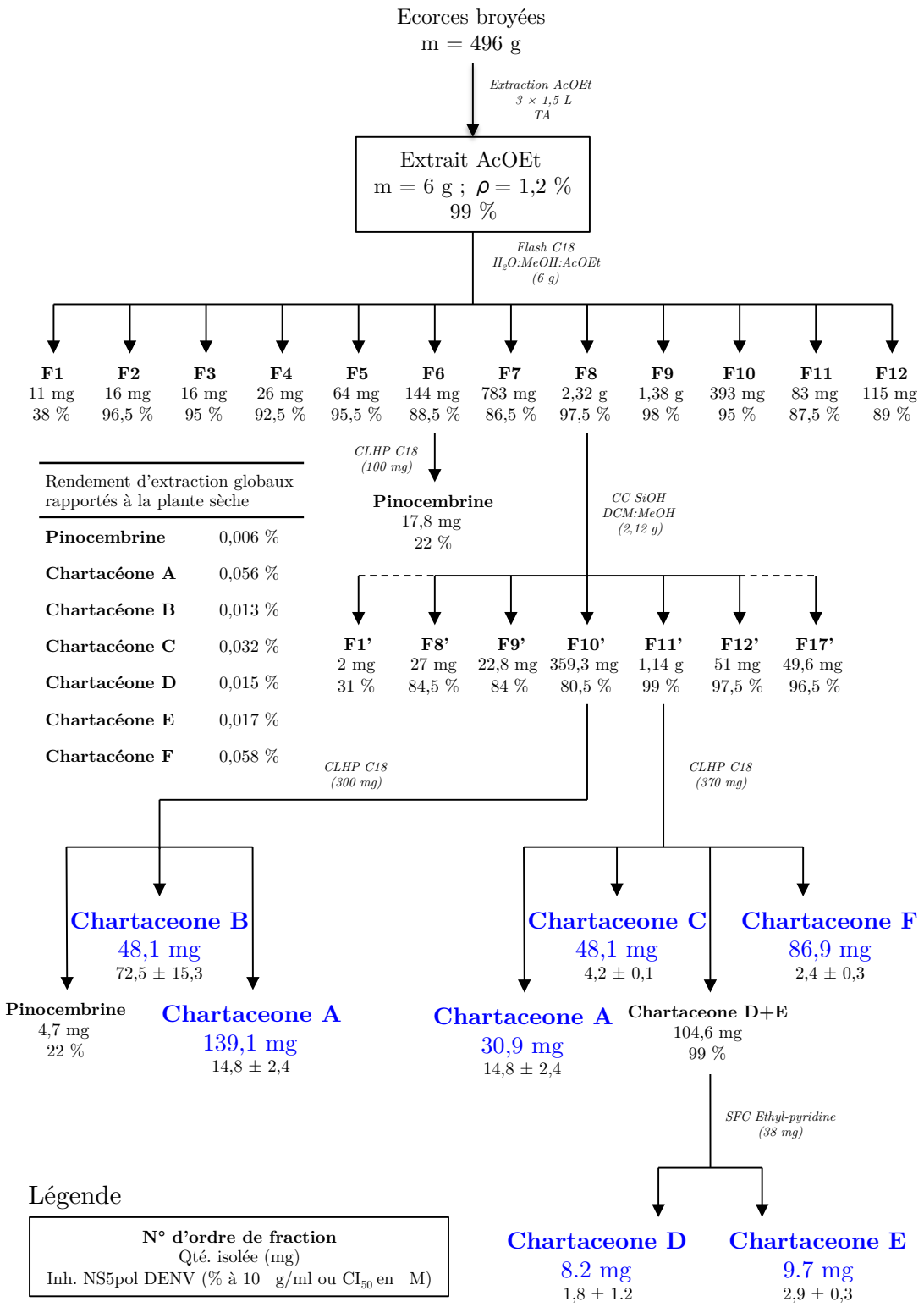



Schéma d'extraction des composés isolés des écorces de *Cryptocarya chartacea activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à* $10\,\mu g\,mL^{-1}$ *ou en* $CI_{50}$ *en* µM*)*

## 2.2 *Trigonostemon cherrieri* Veillon

### 2.2.1 Extrait d'écorces

Dans un premier temps, 1,2 kg d'écorces broyées et séchées de *Trigonostemon cherrieri* (récolte POU-0324) ont été extraits par l'acétate d'éthyle (4 × 1,5 L) puis par le méthanol (4 × 1,5 L), à 40 °C, conduisant à 23 g ($\rho$= 1,9 % p/p) et XX g ($\rho$= X,X % p/p) d'extraits, respectivement.

L'extrait AcOEt (23 g) des écorces a été soumis à une partition liquide/liquide avec comme système *n*-hexanes/$MeOH_{(aq)}$ (MeOH:$H_2O$, 90:10) (2 × 750 mL de *n*-hexanes) conduisant à l'obtention d'une fraction apolaire (14,9 g) et d'une fraction polaire (8 g).

La moitié de l'extrait polaire (4,2 g) a été soumis à une chromatographie Flash $C_{18}$, sur une colonne Versapak (40×75 mm, 70 g), en suivant un gradient $H_2O$:MeOH + 0,1 % AF conduisant ainsi à 20 fractions notées **F1** à **F20**, rassemblées sur la base de leurs profils CCM. L'injection de la fraction **F11** (315 mg) en CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un gradient $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (60:40 à 0:100 en 30 min, à 15 mL $min^{-1}$) conduit à l'obtention de 18 fractions, $\mathbf{F^{11}1}$ à $\mathbf{F^{11}18}$. La purification de la dernière fraction, $\mathbf{F^{11}18}$ (5,7 mg), par CLHP analytique sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (15:85, à 1 mL $min^{-1}$) (collecte manuelle) conduit à l'isolement de la trigocherrine A (**112**) (1,5 mg).

La fraction **F13** (605 mg), soumise à une chromatographie Flash en phase $C_{18}$, sur colonne Versapak (23×110 mm, 30 g), conduit à 24 fractions notées $F^{13}\mathbf{1}$ à $\mathbf{F^{13}24}$, rassemblées sur la base de leurs profils CCM.

La purification de la fraction $\mathbf{F^{13}13}$ (6,9 mg) par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Symetry-Shield® en utilisant un gradient $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (40:60 à 0:80 en 60 min, à 7,8 mL $min^{-1}$) permet le ré-isolement de la trigocherrine A (**112**) (0,6 mg). La purification de la fraction $\mathbf{F^{13}14}$ (7,3 mg) dans les mêmes conditions permet l'isolement de la trigocherrine B (**113**) (0,6 mg). La purification de la fraction $\mathbf{F^{13}21}$ (20,3 mg) par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Symetry-Shield® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (30:70 durant 20 min) suivi d'un gradient (30:70 à 0:100 en 5 min), à 7,8 mL $min^{-1}$ permet l'isolement du trigocherriolide A (**118**) (2,3 mg).

La séparation de la fraction $\mathbf{F^{13}19}$ (33,8 mg) par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (10:90 à 4,7 mL $min^{-1}$) conduit à l'obtention de 5 fractions notées $\mathbf{F^{13.19}1}$ à $\mathbf{F^{13.19}5}$. La fraction $\mathbf{F^{13.19}3}$ (0,9 mg) est

purifiée par CLHP analytique sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (0:100 à 1 mL min$^{-1}$) pour obtenir la trigocherrine C (**114**) (0,26 mg). La fraction $\mathbf{F}^{13.19}\mathbf{4}$ correspond au trigocherriolide B (**119**) (6,3 mg).

Les fractions **F14** et **F15** sont rassemblées au vu de leurs profils similaires en RMN $^1$H et LC-MS. Les fractions **F14** et **F15** rassemblées (1,25 g) sont soumises à une chromatographie Flash $C_{18}$, sur une colonne Versapak (23×110 mm, 30 g), en suivant un gradient $H_2O$:MeOH (80:20 à 30:70 en 30 min puis 30:70 à 0:100 en 120 min, 30 mL min$^{-1}$) conduisant à 29 fractions notées $\mathbf{F}^{14/15}\mathbf{1}$ à $\mathbf{F}^{14/15}\mathbf{29}$, rassemblées sur la base de leurs profils CCM. Après dégraissage à l'hexane de la fraction $\mathbf{F}^{14/15}\mathbf{18}$, on obtient la fraction $\mathbf{F}^{14/15.18}\mathbf{1}$. La fraction $\mathbf{F}^{14/15.18}\mathbf{1}$ (34,3 mg) est chromatographié par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (10:90 à 4,7 mL min$^{-1}$) pour obtenir 7 fractions notées $\mathbf{F}^{14/15.18.1}\mathbf{1}$ à $\mathbf{F}^{14/15.18.1}\mathbf{7}$. La fraction $\mathbf{F}^{14/15.18.1}\mathbf{3}$ correspond au trigocherriolide C (**120**) (1,99 mg). La fraction $\mathbf{F}^{14/15.18.1}\mathbf{4}$ correspond au trigocherriolide A (**118**) (3,25 mg), précédemment isolé. La purification de la fraction $\mathbf{F}^{14/15.18.1}\mathbf{5}$ (1,6 mg) par CLHP analytique sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (10:90 à 1 mL min$^{-1}$) (collecte manuelle) permet l'isolement du trigocherriolide D (**121**) (0,48 mg).

Les schémas 187 et 188 permettent de visualiser les étapes successives de purification conduisant à l'isolement des trigocherrines et des trigocherriolides de l'écorce de *Trigonostemon cherrieri*.

### 2.2.2 Extrait de bois de cœur

Deux extractions AcOEt sont réalisées. Une première extraction fut réalisée par Cyril Poullain en Nouvelle-Calédonie sur environ 200 g de bois sec (Dionex ASE®). Une seconde extraction, sur 700 g de bois sec, est réalisée au Zippertex (100 bars, 40 °C), à l'unité pilote de l'ICSN.

Après comparaison (CCM, RMN $^1$H et LC-MS), les deux extraits sont combinés (6,4 g) puis soumis à une chromatographie Flash $C_{18}$ , sur une colonne Versapak (40×75 mm, 70 g), en suivant un gradient $H_2O$:MeOH (90:10 à 60:40 en 20 min puis 60:40 à 0:100 en 100 min, 30 mL min$^{-1}$) conduisant à 32 fractions notées $\mathbf{F'1}$ à $\mathbf{F'32}$, rassemblées sur la base de leurs profils CCM.

La séparation de la fraction $\mathbf{F'20}$ (106 mg) par CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (35:65 à 21 mL min$^{-1}$) conduit à l'ob-

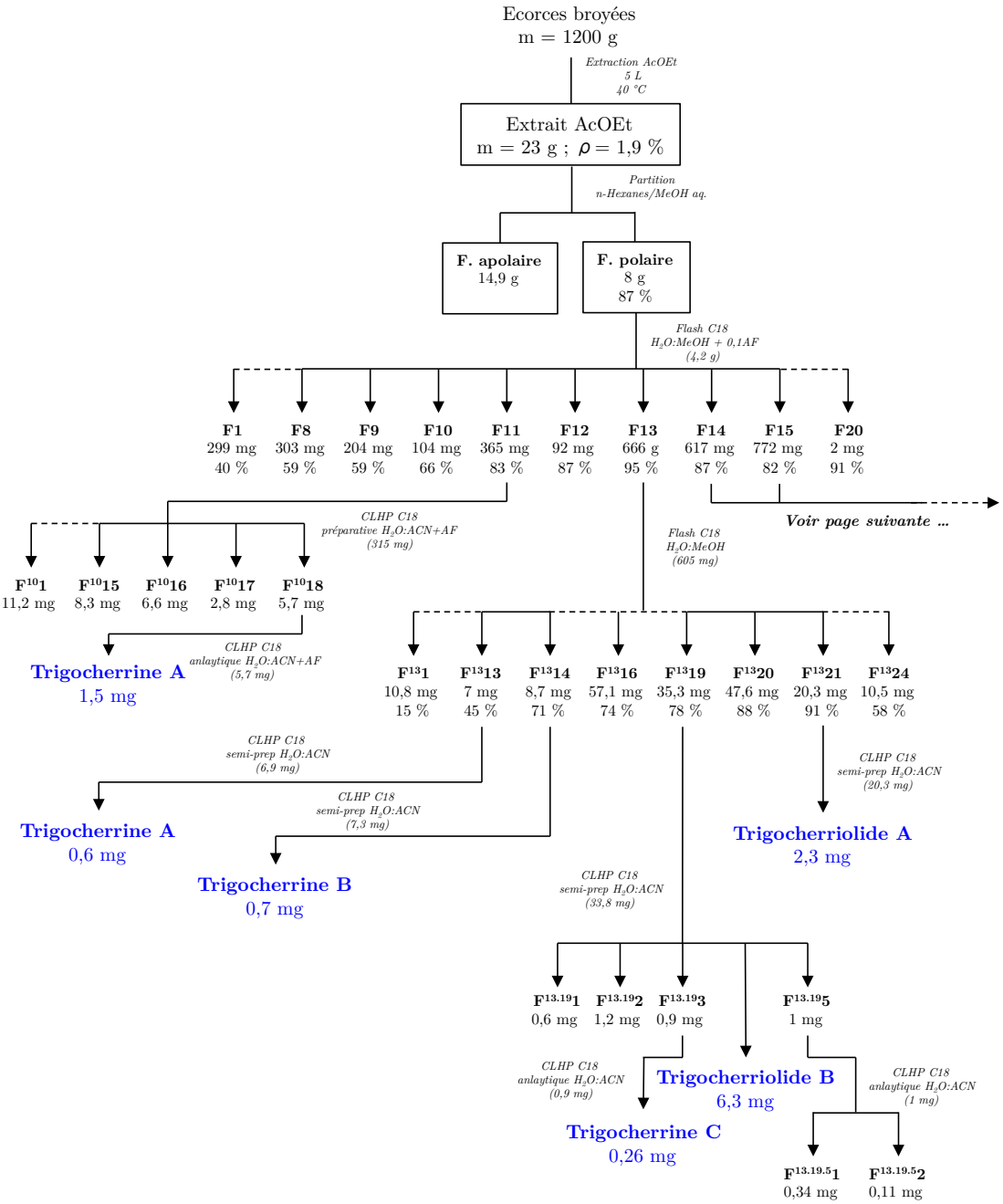



**Figure 187.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie I - *activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à* $10\,\mu g\,mL^{-1}$*) et du CHIKV (*$EC_{50}$ *en* µM*)*

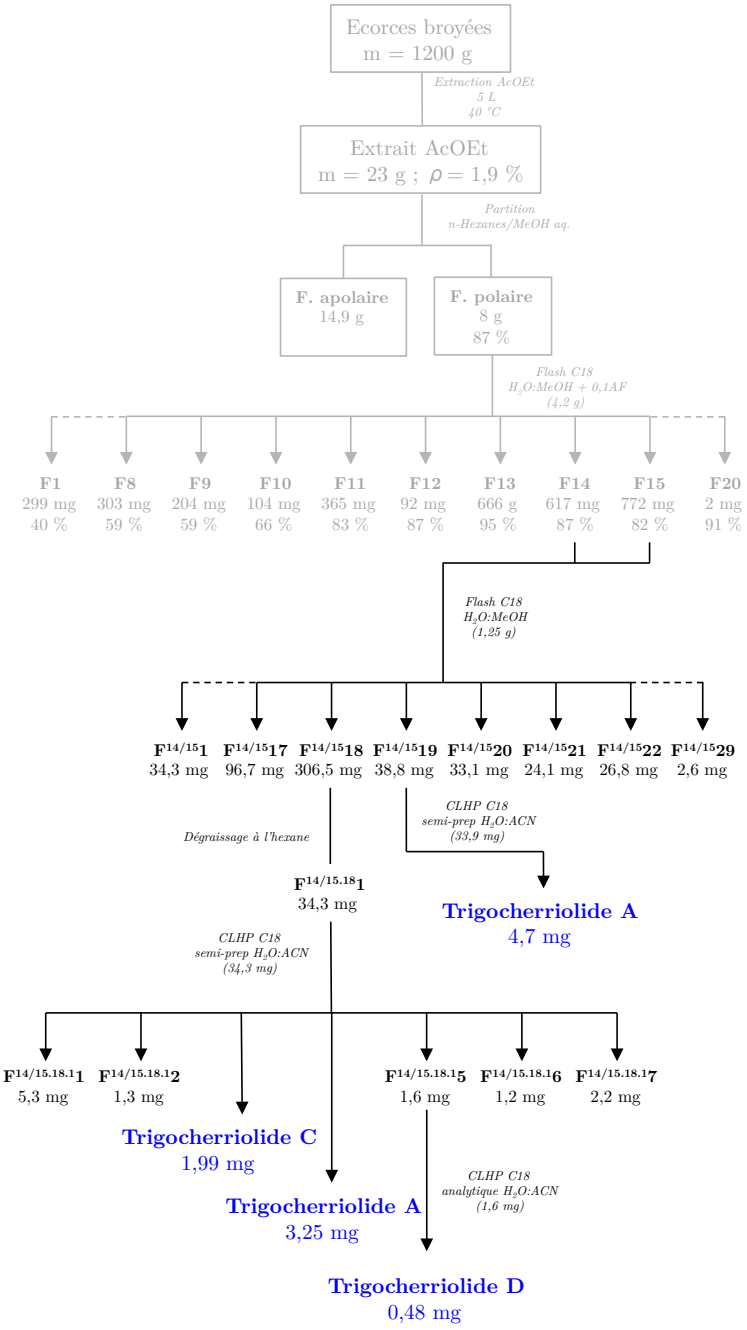



**Figure 188.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *Trigonostemon cherrieri* Partie II

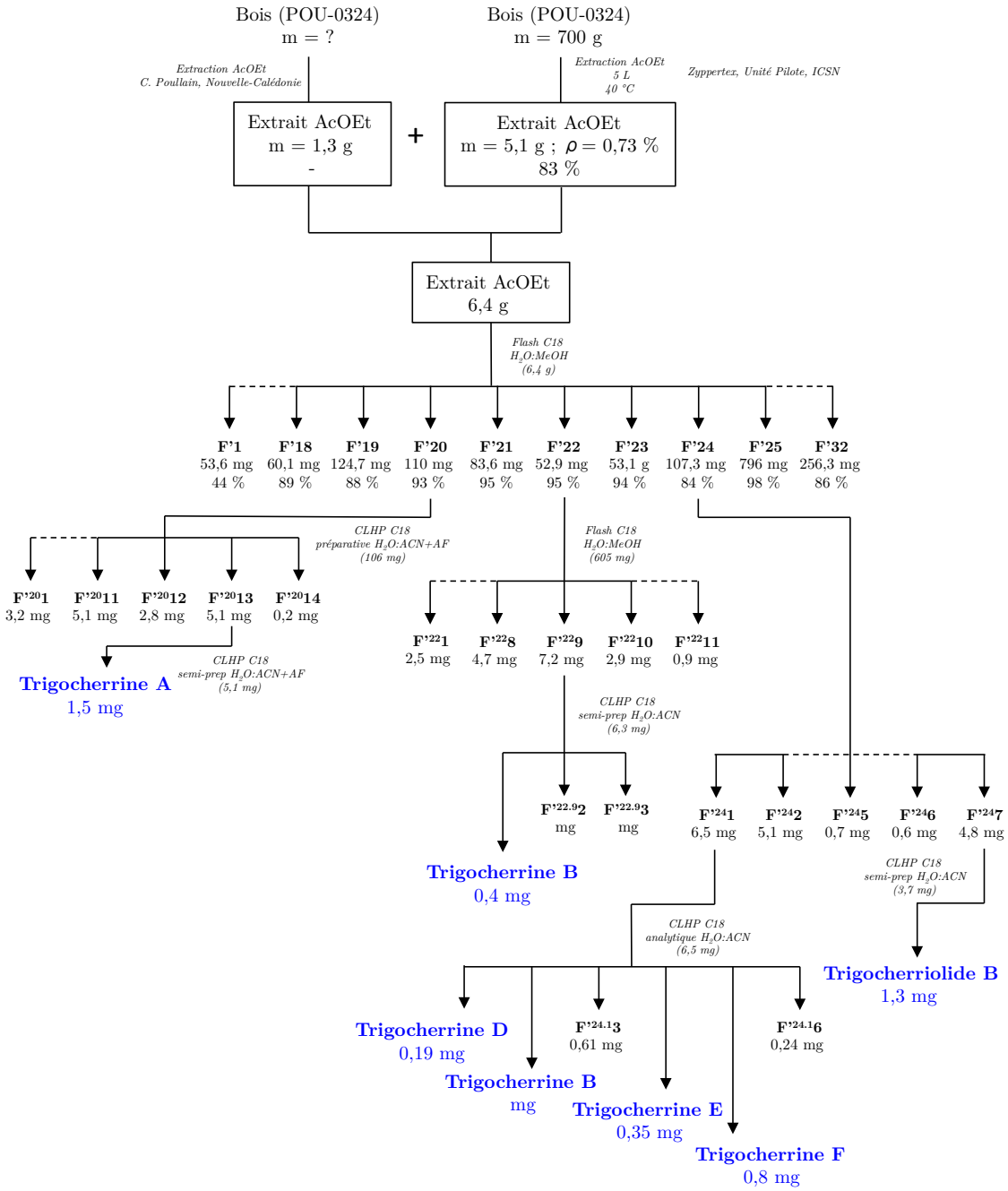



**Figure 189.** Schéma d'obtention des composés à partir de l'extrait AcOEt du bois de cœur *Trigonostemon cherrieri - activité biologique vis-à-vis de l'ARN polymérase du DENV (exprimée en pourcentage d'inhibition à* $10\,\mu g\,mL^{-1}$*) et du CHIKV (*$EC_{50}$ *en* µM*)*

tention de 14 fractions notées $\mathbf{F'^{20}1}$ à $\mathbf{F'^{20}14}$. La purification de la fraction $\mathbf{F'^{20}13}$ (5,1 mg) par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (20:80 à 4,7 mL $min^{-1}$) conduit au réisolement de la trigocherrine A (**112**) (1,5 mg).

La séparation de la fraction $\mathbf{F'22}$ (50 mg) par CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (15:85 à 21 mL $min^{-1}$) conduit à l'obtention de 11 fractions notées $\mathbf{F'^{22}1}$ à $\mathbf{F'^{22}11}$. La purification de la fraction $\mathbf{F'^{22}9}$ (6,3 mg) par CLHP semi-préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (25:75 à 4,7 mL $min^{-1}$) conduit au réisolement de la trigocherrine B (**113**) (0,4 mg).

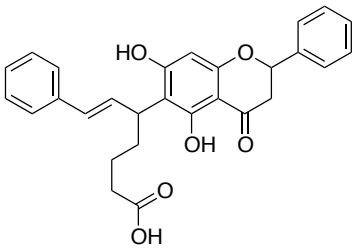
La séparation de la fraction $\mathbf{F'24}$ (100 mg) par CLHP préparative sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN (10:90 à 21 mL $min^{-1}$) conduit à l'obtention de 7 fractions notées $\mathbf{F'^{24}1}$ à $\mathbf{F'^{24}7}$. La purification de la fraction $\mathbf{F'^{24}1}$ (6 mg) par CLHP analytique sur phase $C_{18}$ Kromasil® en utilisant un isocratique $H_2O$:ACN + 0,1 % AF (30:70 à 4,7 mL $min^{-1}$) (collecte manuelle) conduit à l'isolement des trigocherrines D (**115**) (0,19 mg), E (**116**) (0,35 mg) et F (**117**) (0,8 mg) , et au réisolement de la trigocherrine B (**113**). La fraction $\mathbf{F'^{24}7}$ correspond au trigocherriolide B (**119**) (1,3 mg), précédemment isolé.

Le schéma 189 permet de visualiser les étapes successives de purification conduisant à l'isolement des trigocherrines et du trigocherriolide du bois de *Trigonostemon cherrieri*.

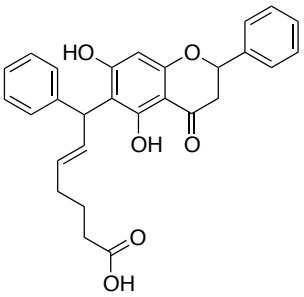
Chapitre 3

# Caractéristiques physiques et spectrales des produits naturels isolés

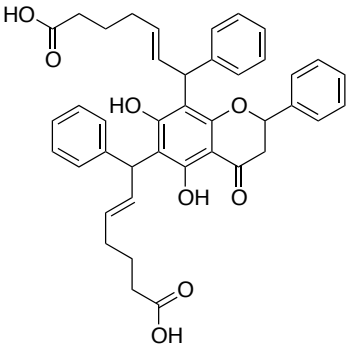
## 3.1 *Cryptocarya chartacea* Kosterm.



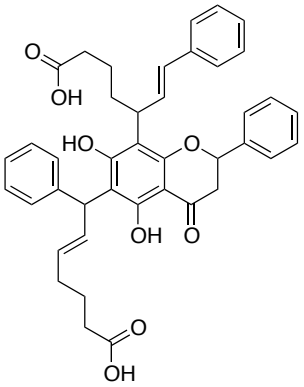

Chartacéone A (**49**)



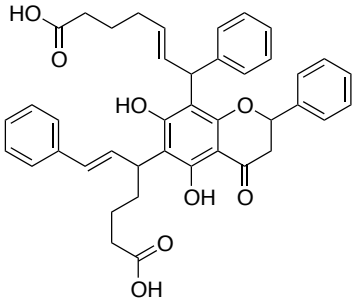

Chartacéone B (**50**)



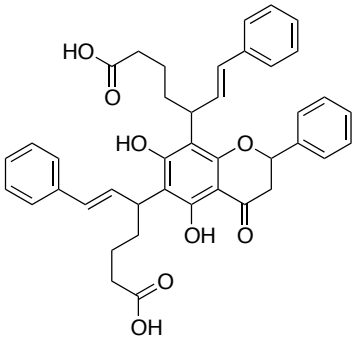

Chartacéone C (**51**)




Chartacéone D (**52**)



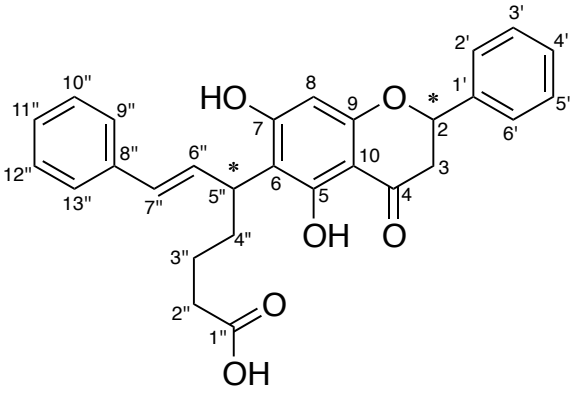

Chartacéone E (**53**)




Chartacéone E (**54**)

Chartacéones isolées des écorces et bois de *Cryptocarya chartacea*

# Chartacéone A (49)




$C_{28}H_{26}O_6$

**M** = 458.5 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,056 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 14,8 ± 2,4 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** laque jaune pâle

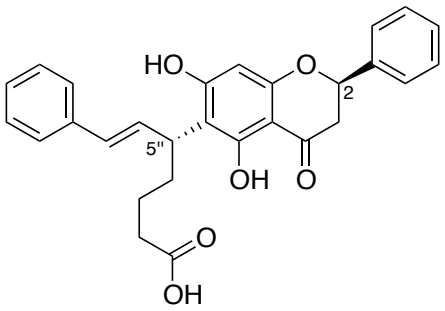
**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 457,1671 (calculée pour $C_{28}H_{25}O_6$, 457,1651)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 341 (épaulement) (3,6), 294 (4,26), 255 (4,36) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : optiquement inactif

**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

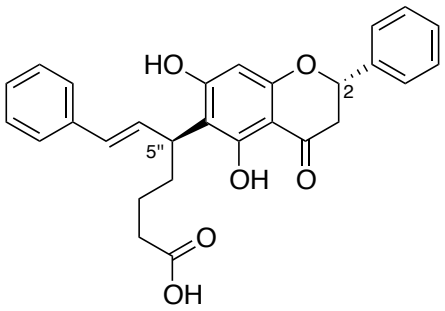
## Chartacéone A1 (55)




$[\alpha]_D^{25}$ : + 82 ($c$ 1,0 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 331 (-1,72), 287 (19,39), 256 (18,00), 220 (-35,05) ($c$ 1,15 $\times$ $10^{-3}$ ; MeOH)

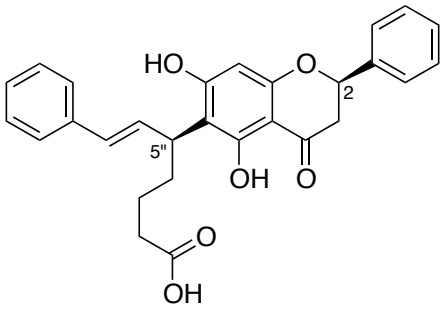
## Chartacéone A4 (58)




$[\alpha]_D^{25}$ : + 88 ($c$ 1,0 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 330 (2,76), 287 (-11,70), 257 (-9,25), 220 (30,02) nm ($c$ 1,15 $\times$ $10^{-3}$ ; MeOH)

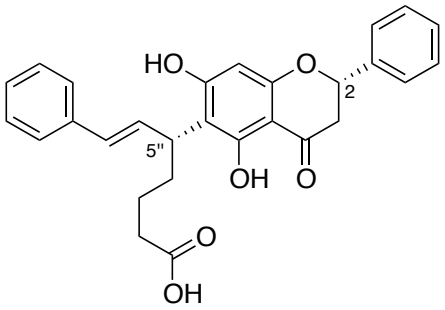
## Chartacéone A2 (55)




$[\alpha]_D^{25}$ : − 56 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 331(-4,62), 289 (7,60), 255 (-25,51), 233 (24,68) nm ($c$ 1,15 $\times$ $10^{-3}$ ; MeOH)

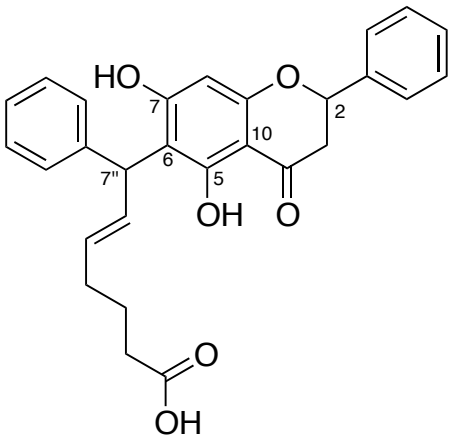
## Chartacéone A3 (58)




$[\alpha]_D^{25}$ : + 56 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 328 (3,41), 290 (-3,94), 255 (24,68), 233 (-14,16) nm ($c$ 1,15 $\times$ $10^{-3}$ ; MeOH)

# Chartacéone B (50)




$C_{28}H_{26}O_6$

**M** = 458.5 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,013 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 72,5 ± 15,3 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** laque jaune pâle

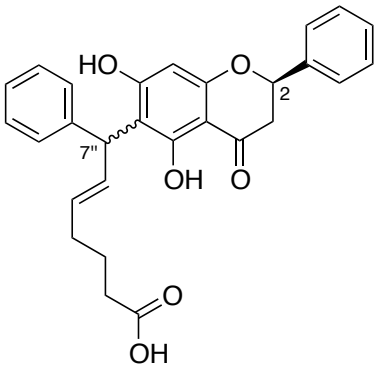
**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 457,1653 (calculée pour $C_{28}H_{25}O_6$, 457,1651)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 341 (épaulement) (3,54), 294 (4,21) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : optiquement inactif

**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

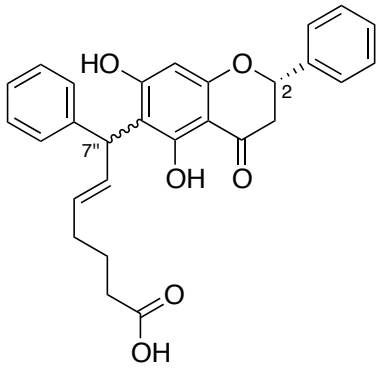
## Chartacéone B1 (59)




$[\alpha]_D^{25}$ : − 31 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 331 (-1,42), 290 (6,16), 220 (-10,80) nm ($c$ 1,15 × $10^{-3}$ ; MeOH)

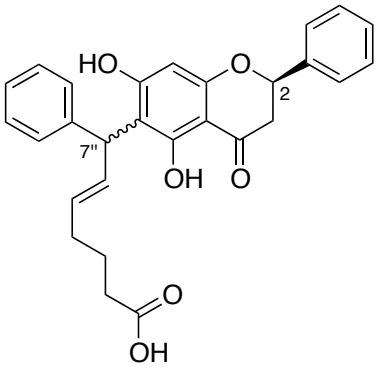
## Chartacéone B4 (62)




$[\alpha]_D^{25}$ : + 35 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 329(0,89), 288 (-4,80), 218 (8,60) nm ($c$ 1,15 × $10^{-3}$ ; MeOH)

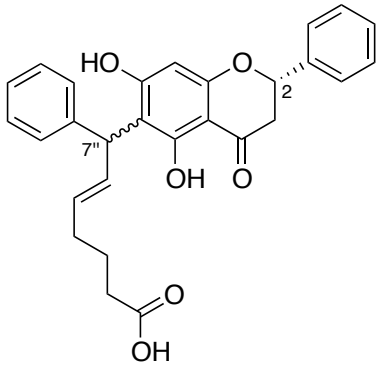
## Chartacéone B2 (60)




$[\alpha]_D^{25}$ : + 45 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 330 (-0,74), 289 (3,10), 221 (-2,77) nm ($c$ 1,15 × $10^{-3}$ ; MeOH)

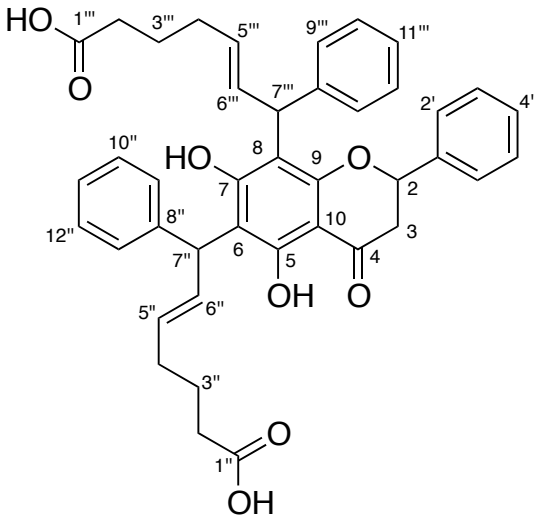
## Chartacéone B3 (61)




$[\alpha]_D^{25}$ : − 47 ($c$ 0,5 ; $CHCl_3$)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 329 (0,98), 290 (-5,06), 220 (5,02) nm ($c$ 1,15 × $10^{-3}$ ; MeOH)

# Chartacéone C (51)




$C_{41}H_{40}O_8$

**M** = 660.75 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,032 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 4,2 ± 0,1 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** poudre amorphe jaune-orangée

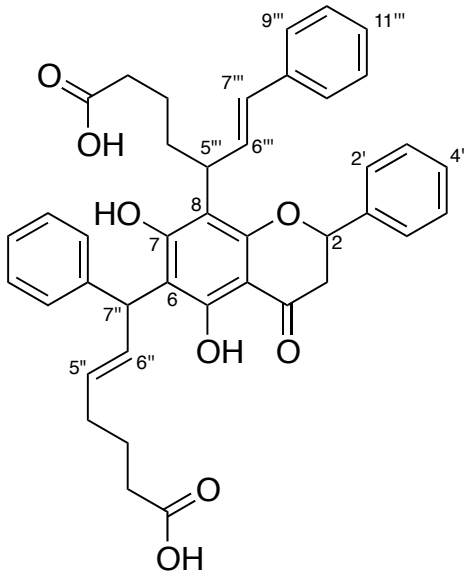
**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 659,2653 (calculée pour $C_{41}H_{39}O_8$, 659,2645)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 341,5 (épaulement) (3,60), 295,5 (3,97) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : optiquement inactif

**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

# Chartacéone D (52)




$C_{41}H_{40}O_8$

**M** = 660.75 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,015 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 1,8 ± 1,2 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** poudre amorphe brune

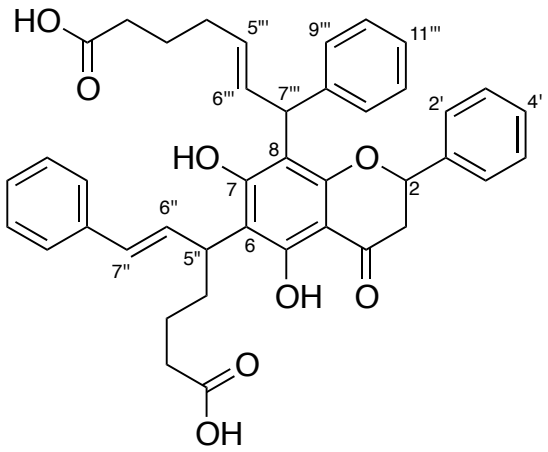
**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 659,2689 (calculée pour $C_{41}H_{39}O_8$, 659,2645)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 340,5 (épaulement) (3,52), 294 (4,07), 254 (4,23) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : optiquement inactif

**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

# Chartacéone E (53)




$C_{41}H_{40}O_8$

**M** = 660.75 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,017 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 2,9 ± 0,3 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** poudre amorphe brune

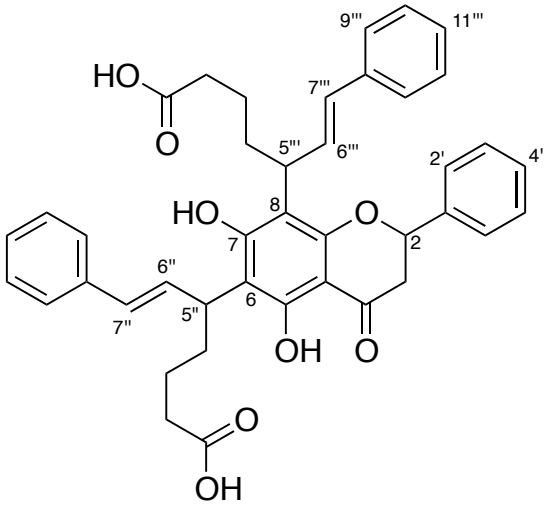
**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 659,2653 (calculée pour $C_{41}H_{39}O_8$, 659,2645)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 341,5 (épaulement) (3,51), 294,5 (4,01), 254 (4,18) nm

**[**$\alpha$**]**$_D^{25}$ : optiquement inactif

**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

# Chartacéone F (54)




$C_{41}H_{40}O_8$

**M** = 660.75 g mol$^{-1}$

**Origine** *Cryptocarya chartacea*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = 0,058 % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 2,4 ± 0,3 µM
KB : > 10 µg mL$^{-1}$

**Aspect :** poudre amorphe jaune-orangée

**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 659,2603 (calculée pour $C_{41}H_{39}O_8$, 659,2645)

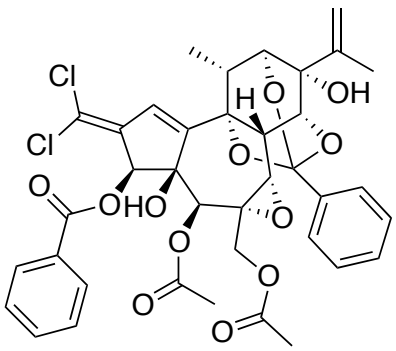
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 340,5 (épaulement) (3,76), 294 (4,24), 250 (4,48) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : optiquement inactif

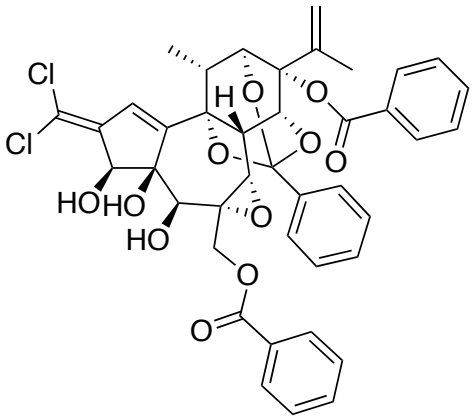
**RMN $^1$H et $^{13}$C (300 MHz, $CD_3OD$)** : voir Annexe 4, page 305 et Annexe 5, page 307, respectivement.

## 3.2 *Trigonostemon cherrieri* Veillon

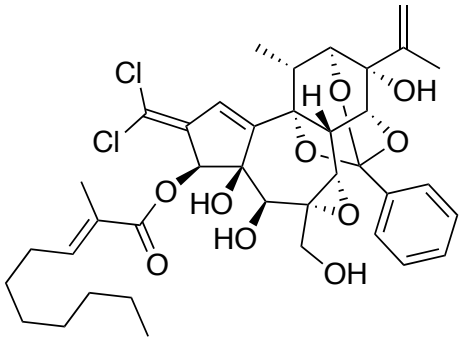
# Trigocherrines isolées des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*



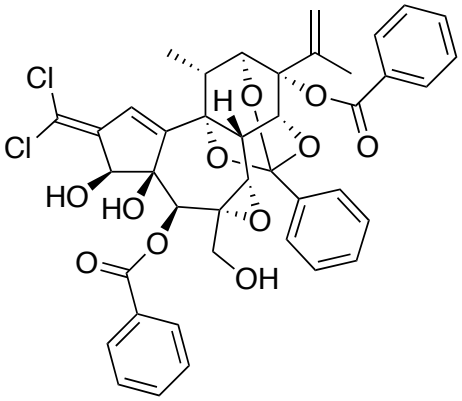
Trigocherrine A (**112**)



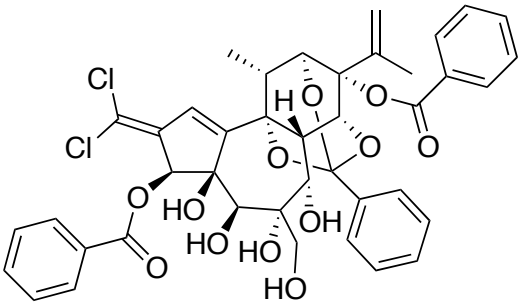
Trigocherrine B (**113**)



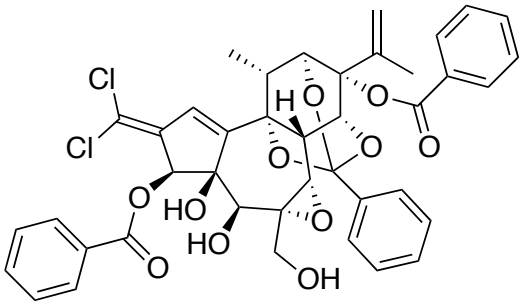
Trigocherrine C (**114**)



Trigocherrine D (**115**)

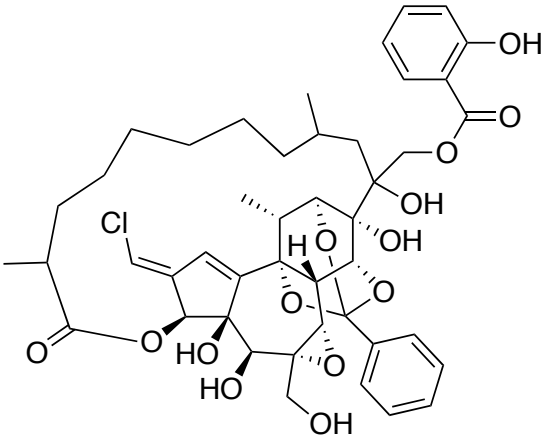


Trigocherrine E (**116**)

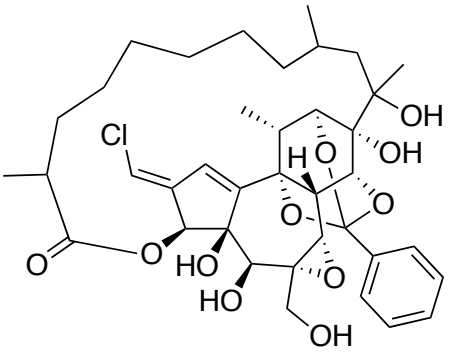


Trigocherrine F (**117**)

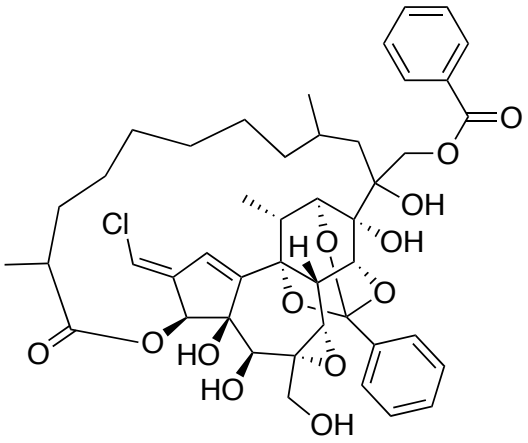
# Trigocherriolides isolées des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*



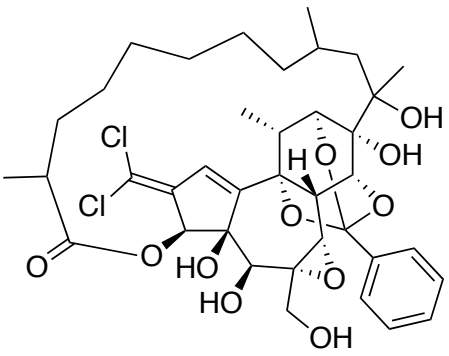

Trigocherriolide A (**118**)




Trigocherriolide B (**119**)

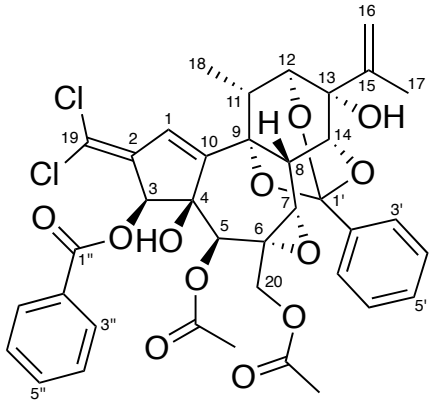



Trigocherriolide C (**120**)




Trigocherriolide D (**121**)

# Trigocherrine A (112)




$C_{38}H_{36}Cl_2O_{12}$

**M** = 755.59 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : 12,7 ± 0,2 µM
CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 755,1657 (calculée pour $C_{38}H_{37}Cl_2O_{12}$, 755,1662)

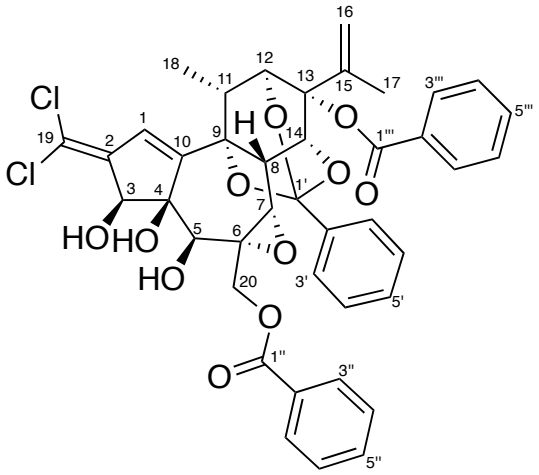
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 267 (4,01), 233 (3,87) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 150 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 267 (− 11,4) nm ($c$ 5 × $10^{-4}$ ; $CHCl_3$)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherrine B (113)




$C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}$

**M** = 775.62 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+Na]^+$ $m/z$ = 797,1602 (calculée pour $C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}Na$, 797,1532)

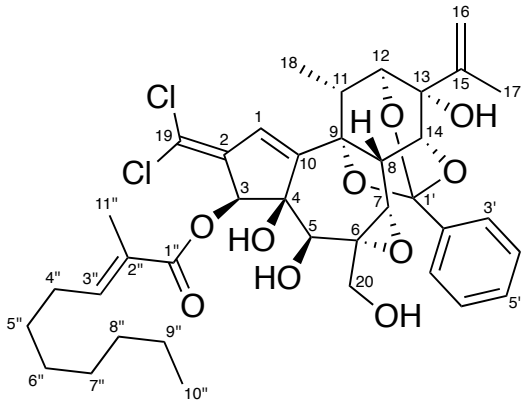
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 266 (4,26) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 105 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 265 (− 3,7), 210 (+ 1,7) nm ($c$ 1 × $10^{-3}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherrine C (114)




$C_{38}H_{46}Cl_2O_{10}$

**M** = 733.67 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = % p/p)

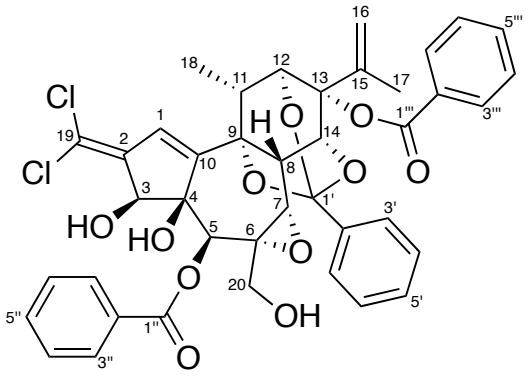
**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 733,2513 (calculée pour $C_{38}H_{47}Cl_2O_{10}$, 733,2546)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherrine D (115)




$C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}$

**M** = 775.62 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt de bois ($\rho$ = % p/p)

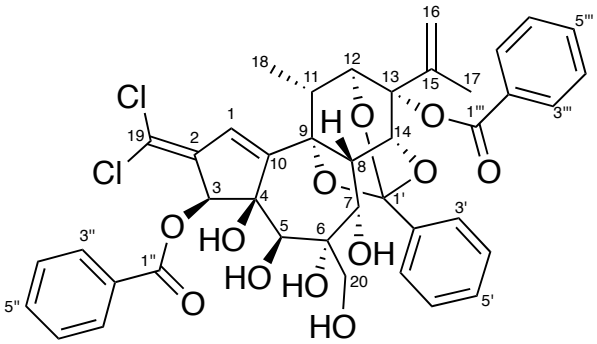
**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 775,1769 (calculée pour $C_{41}H_{37}Cl_2O_{11}$, 775,1713)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherrine E (116)




$C_{41}H_{38}Cl_2O_{12}$

**M** = 793.64 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt de bois ($\rho$ = % p/p)

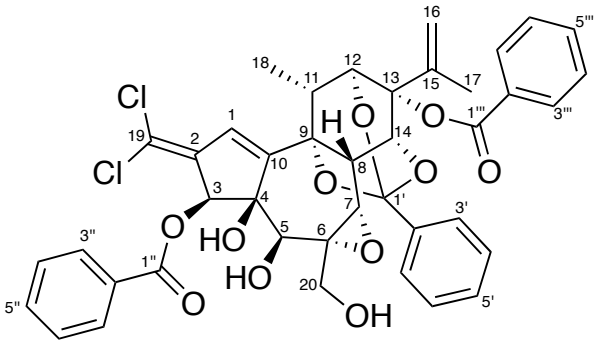
**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 793,1888 (calculée pour $C_{41}H_{39}Cl_2O_{12}$, 793,1819)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherrine F (117)




$C_{41}H_{36}Cl_2O_{11}$

**M** = 775.62 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt de bois ($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 775,1785 (calculée pour $C_{41}H_{37}Cl_2O_{11}$, 775,1713)

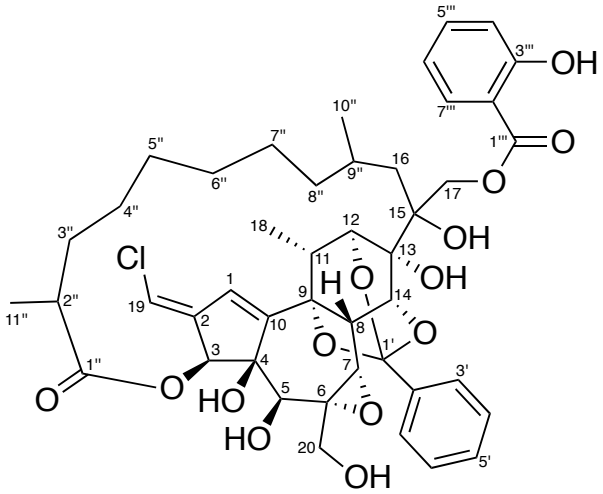
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 266 (4,40) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 85 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 268 (− 5,3), 224 (+ 1,8) nm ($c$ 8 × $10^{-4}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 10, page 335.

# Trigocherriolide A (118)




$C_{45}H_{53}ClO_{14}$

**M** = 853.35 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc et de bois($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+Na]^+$ $m/z$ = 875,3089 (calculée pour $C_{45}H_{53}ClO_{14}Na$, 875,3021)

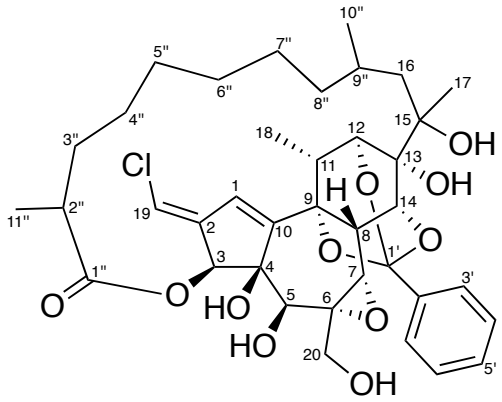
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 303 (3,87), 255 (4,31), 242 (4,34) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 9 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 254 (− 9,1) nm ($c$ 1 × $10^{-3}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 11, page 337.

# Trigocherriolide B (119)




$C_{38}H_{49}ClO_{11}$

**M** = 717.24 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc et de bois($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 717,3062 (calculée pour $C_{38}H_{50}ClO_{11}$, 717,3042)

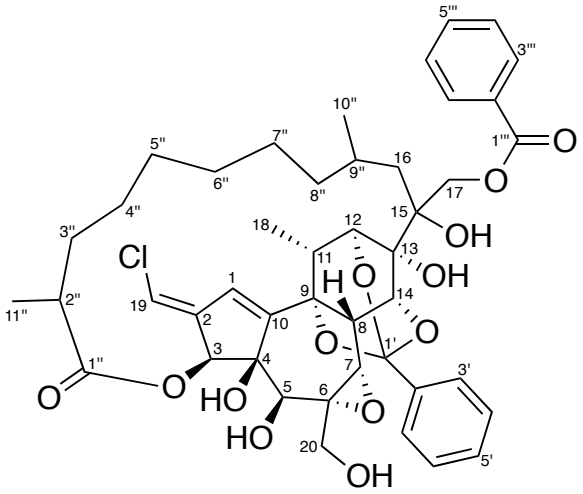
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 255 (4,41) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 10 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 253 (− 9,7), 210 (+ 5,0) nm ($c$ 1 × $10^{-3}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 11, page 337.

# Trigocherriolide C (120)




$C_{45}H_{53}ClO_{13}$

**M** = 837.35 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES+)** $[M+H]^+$ $m/z$ = 837,3251 (calculée pour $C_{45}H_{54}ClO_{13}$, 837,3253)

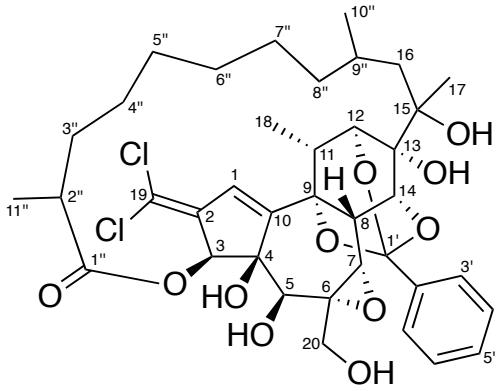
**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 256 (4,36) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 65 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 256 (− 6,2), 210 (+ 3,4) nm ($c$ 1 × $10^{-3}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 11, page 337.

# Trigocherriolide D (121)




$C_{38}H_{48}Cl_2O_{11}$

**M** = 751.69 g mol$^{-1}$

**Origine** *Trigonostemon cherrieri*, extrait AcOEt d'écorces de tronc ($\rho$ = % p/p)

**Activités biologiques**
DENV NS5 RdRp : CHIKV *in cellulo* : KB :

**Aspect :** poudre amorphe blanche

**SHMR (ES-)** [M-H]$^-$ $m/z$ = 749,2465 (calculée pour $C_{38}H_{47}Cl_2O_{11}$, 749,2495)

**UV**, $\lambda_{max}$ (MeOH) (log $\varepsilon$) : 267 (4,27) nm

$[\alpha]_D^{25}$ : − 9 ($c$ 0,1, MeOH)

**DC** , $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) : 265 (− 9,5), 211 (+ 4,0) nm ($c$ 2 × 10$^{-3}$ ; MeOH)

**RMN $^1$H et $^{13}$C (600 MHz, $CDCl_3$)** : voir Annexe 11, page 337.

# Chapitre 4

# Essais biologiques

## 4.1 Évaluation de l'inhibition de la NS5 RdRp du DENV

L'évaluation de l'inhibition de la NS5 RdRp du DENV se déroule à la Plateforme de Criblage Marseille-Luminy sous la direction de Jean-Claude Guillemot (UMR6098, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques).

**Construction des plasmides Dengue 2 NS5 polymérase, préparation des enzymes et réactifs.** Les gènes NS5 polymérase du DENV2 ont été marqués par six résidus histidine N-terminaux et exprimés par le vecteur pQE30 (Qiagen) dans des cellules *E. coli* Rosetta pLacI (Novagen). Les enzymes ont été produits et purifiés comme précédemment décrite par Selisko et al. La cytosine homopolymériques poly(rC) a été obtenue auprès de GE Healthcare. Le GTP tritié [$^3$H]GTP (5,1 Ci / mmol) a été acheté chez Perkin.

**Évaluation de l'activité enzymatique de la polymérase de dengue.** L'activité polymérase a été évalué par le suivi de l'incorporation de la guanosine radiomarquée dans un modèle de cytosine homopolymériques poly(rC), comme précédemment décrit.

**Criblage.** Le criblage a été réalisé sur des extraits de plantes (écorce, feuilles) et leurs fractions. La qualité des mesures a été évaluée par le calcul du facteur Z′ pour chaque plaque:

$$Z' = 1 - \frac{3SD(neg) + 3SD(pos)}{avg(neg) - avg(pos)}$$

Où SD(neg) et SD(pos) représentent l'écart type obtenu pour les contrôles négatifs et positifs, respectivement, et où avg(neg) et avg(pos) sont les moyennes pour les contrôles négatifs et positifs, respectivement. Le facteur Z′ a une valeur moyenne de 0,834 avec un écart type de 0,058 pour les plaques indiquant qu'il y a une vaste gamme de points de données entre la ligne de base et les signaux positifs. Pour chaque composé, le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$\%_{\text{inhibition}} = 100 \times \frac{\text{données du composé} - avg(pos)}{avg(neg) - avg(pos)}$$

La bibliothèque de produits naturels a été répartie dans des plaques 96 puits, contenant chacune 80 échantillons. Les contrôles positifs et négatifs sont distribués dans les premières colonnes et $12^{me}$ colonne, respectivement. Le criblage consiste en l'évaluation *in vitro* de l'incorporation de nucléotides par la polymérase NS5 et se base sur l'utilisation d'une enzyme recombinante NS5pol de DENV pleinement fonctionnelle ainsi qu'une matrice poly(rC).

Les réactions ont lieu dans des volumes de 20 µL . Les contrôles positifs et négatifs se composent d'un mélange réactionnel (50 mM HEPES pH 8,0, 10 mM KCl, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 100 mM de matrice ARN poly(RC), 20 nM de NS5) complété par 10 µM de [$^3$H]-GTP (0,25 $\mu$Ci) et 5% de DMSO ou 20 µM d'EDTA, respectivement. Pour chaque essai, le mélange enzymatique est d'abord distribué dans les puits de la plaque en utilisant un robot Biomek 3000 (Beckman). Chacun des 80 échantillons a ensuite été ajouté à l'analyse en utilisant un robot Biomek NX (Beckman) à une concentration finale de 50 µg $mL^{-1}$ dans 5% DMSO. Les réactions sont initiées par l'addition de 10 µM de [$^3$H]-GTP (0,25 $\mu$Ci), incubées à 30 ° C, puis arrêtées au bout de 10 min par l'addition d'EDTA (concentration finale de 100 mM). Toutes les distributions de produits et réactifs ont été effectuées avec le Biomek 3000. Les produits de réaction sont ensuite transférés sur membrane de papier 81 DE (Whatman International Ltd.), avec le Packard Filtermate Harvester. Les membranes de papier filtre sont lavées trois fois par le formiate d'ammonium 0,3 M, pH 8,0, lavées deux fois à l'éthanol puis séchées. La radioactivité présente sur le filtre est déterminée en utilisant le comptage à scintillation liquide (Wallac Microbeta ® Trilux). Les fractions ou les composés purs montrant 80 % ou plus de réaction d'inhibition sont sélectionnés et utilisés pour générer de nouvelles plaques d'expérimentation. Ces plaques expérimentales sont utilisées pour

un second criblage à 10 µg mL$^{-1}$ concentration finale, avec la même procédure expérimentale. Les composés conduisant à une inhibition de 80 % ou plus lors du second criblage sont qualifiés de hits. Les hits sont ensuite confirmés sur le composé fraîchement solubilisé et les $CI_{50}$ sont déterminées.

**Détermination des $CI_{50}$** La concentration du composé conduisant à une inhibition de 50% de la synthèse d'ARN par la NS5 est déterminée dans le même tampon que pour les criblages (cf. section **Criblage, ci-dessus**) contenant 100 nM de matrice ARN poly(rC), 40 nM de NS5 et diverses concentrations du composé (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 µM). Les réactions, incubées à 30 ° C, sont initiées par l'ajout de 40 µMde [$^3$H]-GTP (0,2 $\mu$Ci). Après 5 min d'incubation, la réaction est stoppée par l'addition d'EDTA (concentration finale de 100 mM). Les produits de réaction sont transférés sur membrane de papier 81 DE (Whatman International Ltd.), avec le Packard Filtermate Harvester. Les membranes de papier filtre sont lavées trois fois par le formiate d'ammonium 0,3 M, pH 8,0, lavé deux fois à l'éthanol puis séchées. La radioactivité présente sur le filtre est déterminée en utilisant le comptage à scintillation liquide (Wallac Microbeta ® Trilux). L'activité résiduelle pour chaque concentration de la gamme est évaluée et la $CI_{50}$ est déterminée en utilisant l'équation :

$$\%_{\text{activité enzymatique}} = \frac{100}{\frac{1+I^2}{CI_{50}}}$$

Où I est la concentration de l'inhibiteur. Les $CI_{50}$ sont déterminées par ajustement de courbe en utilisant le programme Kaleidagraph (Synergy Software). Pour chaque valeur, les résultats sont obtenus en triplicate dans la même expérience.

## 4.2 Évaluation de l'inhibition du CHIKV *in cellulo*

La totalité de l'essai pour l'évaluation de l'activité antivirale potentielle des composés contre le virus Chikungunya (souche 899) est réalisée sur robot Freedom EVO200 (Tecan) dans une enceinte de sureté biologique (Bigneat). Ces essais sont menés au Laboratory of Virology and Chemotherapy sous la direction de Pieter Leyssen (Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique.)

**Identification des hits** Le criblage à haut débit pour l'identification des hits est effectué selon le protocole suivant en une seule étape:

Tous les puits d'une plaque 96-puits sont remplis avec 100 µL du milieu tampon. Par la suite, une gamme de dilution de 1 à 5 en 4 points des différents extraits se fait en deux volets: une série de puits est destinée à l'évaluation de l'effet anti-métabolique et une série à l'évaluation de l'activité antivirale. Dans l'étape suivante, 50 µL de milieu tampon (test anti-métabolique) ou 50 µL d'une dilution du virus 4x est ajouté. Enfin, les cellules Vero (rein de singe vert d'Afrique), cultivées en flacons de culture tissulaire de 75 $cm^2$ pendant 7 jours et récoltées par trypsinisation, sont remises en suspension dans le milieu tampon et 50 µL de suspension cellulaire (contenant ∼25 000 cellules) sont ajoutés à chaque puits. Les plaques 96-puits sont operculées puis incubées (37 °C, 5% de $CO_2$, 99% d'humidité relative) pendant 5-7 jours (durée équivalente à celle nécessaire à l'observation de 100% de l'effet cytopathogène induit par le virus chez les cultures cellulaires infectées mais non-traitées.) Les plaques 96-puits sont ensuite rechargées sur le robot. Le surnageant contenant les virus est aspiré par un laveur de plaques de microtitration (Hydroflex, Tecan), après quoi 75 µL d'une solution à 5% de MTS, sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 1,5 à 2 heures (37 ° C, 5% CO2, 99% d'humidité relative). Le changement de couleur du jaune au brun, causée uniquement par les cellules métaboliquement actives, est quantifiée à une longueur d'onde de 498 nm (Safire$^2$, Tecan), après quoi les données brutes sont traitées et représentées comme pourcentage des contrôles. Quand c'est possible, la $CC_{50}$ (concentration en $\mu g\,mL^{-1}$ pour laquelle 50% d'inhibition du métabolisme cellulaire chez les cellules traitées, non-infectées est observée), $CE_{50}$ et $CE_{90}$ (concentration en $\mu g\,mL^{-1}$ pour laquelle respectivement 50% et 90% d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus dans les cellules traitées et infectées est observé) sont calculées. Pour exclure les faux positifs, les plaques de microtitration contenant des composés potentiellement actifs, sont vérifiées au microscope.

**Confirmation des hits** Ce protocole en une seule étape est globalement le même que celui décrit ci-dessus, sauf que dans ce cas, une gamme de dilution de 1 à 2 en 8 points est faite pour permettre l'affinage des données antivirales. Les échantillons qui inhibent sélectivement la réplication CHIKV, sont ensuite évalués à nouveau en double

afin de vérifier la reproductibilité de l'effet antiviral et l'influence des congélations-décongélations répétées du stock de DMSO sur l'effet anti-métabolique et antiviral des composés.

## 4.3 Évaluation de la cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des fractions et produits purs est effectuée à l'ICSN (Equipe 21, Geneviève Aubert et Thierry Cresteil.)

Les essais de cytotoxicité sur lignées cellulaires KB (cancer du nasopharynx) et MRC-5 (cellules saines, fibroblastes pulmonaires d'embryons humains) ont été réalisés à l'ICSN par Geneviève Aubert, d'après la procédure publiée par Tempête *et al.*[288] Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM à 37 °C, puis placées à 37 °C sous atmosphère 95% d'air et 5% de $CO_2$ 4 jours avant le test, et enfin comptées afin de déterminer leur densité. Elles sont ensuite diluées pour obtenir un nombre constant de cellules par puits, puis distribuées en plaques 96 puits. Après 24 h, les produits à tester sont déposés en duplicat ainsi que le témoin positif (Taxotère® (docétaxel)). Après 3 jours d'incubation, l'inhibition potentielle de la prolifération cellulaire est évaluée par ajout de MTS (réactif Proméga). Ce révélateur, en se fixant sur les mitochondries des cellules vivantes, est réduit en formazan coloré qui absorbe à 490 nm (plus la coloration est faible, plus le produit est actif). Après 2 h d'incubation, la densité optique (DO) de chaque puits est mesurée par spectrophotométrie. On peut alors déterminer le pourcentage de cellules vivantes par rapport au témoin (puits avec du DMSO) et par conséquent le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire, à une concentration donnée, d'après la formule :

$$\%_{\text{inhibition}} = [1 - \frac{\text{DO}_{\text{puits}}}{\text{DO}_{\text{témoin}}}]$$

Les tests sont généralement réalisés à 10 puis 1 $\mu g\,mL^{-1}$ lors des premiers essais. En cas de résultats positifs, des mesures de $CI_{50}$ (concentration minimum pour avoir 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire) sont alors réalisées en évaluant la cytotoxicité d'un produit sur une échelle de concentrations et ainsi déterminer la concentration pour avoir 50 % d'inhibition à partir des courbes dose-réponse.

288. Tempête, C et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30* 647–650.

# Bibliographie


1. Spainhour, C. B., *Drug Discovery Handbook*; John Wiley & Sons Inc. : 2005, p. 11–63.
2. WHO *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*, rap. tech., Geneva : WHO, 2002.
3. Weissman, K. J. ; Leadlay, P. F., "Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides." *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3*, 925–36.
4. Brower, V., "Back to nature : extinction of medicinal plants threatens drug discovery." *J. Natl. Cancer I.*, **2008**, *100*, 838–9.
5. Goodman, M., "Pharmaceutical industry financial performance." *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, *8*, 927–8.
6. Guzman, M. G. ; Halstead, S. B. ; Artsob, H. ; Buchy, P. ; Farrar, J. ; Gubler, D. J. ; Hunsperger, E. ; Kroeger, A. ; Margolis, H. S. ; Martínez, E. ; Nathan, M. B. ; Pelegrino, J. L. ; Simmons, C. ; Yoksan, S. ; Peeling, R. W., "Dengue : a continuing global threat." *Nat. Rev. Microbiol.*, **2010**, *8*, S7–S16.
7. Coller, B.-A. G. ; Clements, D. E., "Dengue vaccines : progress and challenges" *Curr. Opin. Immunol.*, **2011**, *23*, 1–8.
8. Jaffré, T. ; Morat, P. ; Veillon, J.-M. ; Rigault, F. ; Dagostini, G., *Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-Calédonie*; IRD : 2001.
9. Sévenet, T. ; Potier, P. dans *Substances naturelles d'intérêt biologique du Pacifique*, Nouméa, 1979.
10. Sévenet, T. ; Pusset, J. ; Bourret, D. ; Potier, P. *Etudes sur les plantes médicinales de Nouvelle-Calédonie*, rap. tech., 1991, p. 71.
11. Svoboda, G. H. ; Poore, G. A. ; Montfort, M. L., "Alkaloids of *Ochrosia maculata* Jacq. (*Ochrosia borbonica* Gmel.) Isolation of the alkaloids and study of the antitumor properties of 9-methoxyellipticine" *J. Pharm. Sci.*, **1968**, *57*, 1720–1725.
12. Sévenet, T. ; Potier, P. *Mission C.N.R.S. en Nouvelle-Calédonie 1967-1979*, rap. tech., 1979, p. 32.
13. Kan-Fan, C ; Lounasmaa, M., "Sur les Alcaloïdes de *Knightia deplanchei* Vieill. ex Brongn. et Gris (Protéacées)" *Acta Chem. Scand*, **1973**, *27*, 1039–1052.
14. Lounasmaa, M ; Pusset, J. ; Sévenet, T., "Benzyl-2 pseudotropanes et dihydro $\gamma$-pyranotropanes, alcaloïdes de *Knightia strobilina*" *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 953–955.

15. Païs, M ; Sarfati, R. ; Jarreau, F. ; Goutarel, R., "Alcaloïdes des *Homalium* : Structure de l'homaline, de l'hopromine, de l'hoprominol et de l'hopromalinol" *Tetrahedron*, **1973**, *29*, 1001–1010.

16. Leboeuf, M. ; Cavé, A. ; Paris, R., "No Title" *Pl. Méd. et Phytothér.*, **1971**, *5*, 126.

17. Cosson, J. P. ; Smid, M., "Les alcaloïdes d'*Ochrosia silvatica* (Apocynacées)" *Phytochemistry*, **1970**, *9*, 1353–1354.

18. Kan-Fan, C ; Das, B. C. ; Potier, P., "Alcaloïdes des feuilles d'*Ochrosia vieillardii* (apocynacées)" *Phytochemistry*, **1970**, *9*, 1351–1352.

19. Bruneton, J ; Sévenet, T. ; Cavé, A., "Alcaloïdes des écorces d'*Ochrosia vieillardii*" *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 3073–3075.

20. Polonsky, J. ; Van Tri, M. ; Prang, T. ; Pascard, C. ; Sevenet, T., "Isolation and structure (X-ray analysis) of a new C25 quassinoid soulameolide from *Soulamea tomentosa*" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 641.

21. Guéritte, F. ; Dumontet, V. ; Poullain, C. ; Litaudon, M. ; Sévenet, T., "Plantes de Nouvelle-Calédonie d'intérêt biologique : de la création du "Laboratoire des Plantes Médicinales" (ICSN-CNRS) à Nouméa aux recherches actuelles" *Ethnopharmacologia*, **2010**, *45*, 47–49.

22. Sévenet, T. *Plantes médicinales et Substances marines, le point sur les recherches et le projet du CNRS*, rap. tech., 1993, p. 13.

23. Jolly, C. ; Thoison, O. ; Martin, M.-T. ; Dumontet, V. ; Gilbert, A. ; Pfeiffer, B. ; Léonce, S. ; Sévenet, T. ; Guéritte, F. ; Litaudon, M., "Cytotoxic turrianes of *Kermadecia elliptica* from the New Caledonian rainforest." *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 533–40.

24. Beniddir, M. A. ; Simonin, A.-L. ; Martin, M.-T. ; Dumontet, V. ; Poullain, C. ; Guéritte, F. ; Litaudon, M., "Turrianes from *Kermadecia rotundifolia* as new acetylcholinesterase inhibitors" *Phytochem. Lett.*, **2010**, *3*, 75–78.

25. Morel, C. ; Séraphin, D. ; Teyrouz, A. ; Larcher, G. ; Bouchara, J.-P. ; Litaudon, M. ; Richomme, P. ; Bruneton, J., "New and antifungal xanthones from *Calophyllum caledonicum*." *Planta Med.*, **2002**, *68*, 41–4.

26. Lichius, J. J. ; Thoison, O. ; Montagnac, A. ; Païs, M. ; Guéritte-Voegelein, F. ; Sévenet, T. ; Cosson, J.-P. ; Hadi, A. H. A., "Antimitotic and Cytotoxic Flavonols from *Zieridium pseudobtusifolium* and *Acronychia porteri*" *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1012–1016.

27. Bousserouel, H. ; Litaudon, M. ; Morleo, B. ; Martin, M.-T. ; Thoison, O. ; Nosjean, O. ; Boutin, J. ; Renard, P. ; Sévenet, T., "New biologically active linear triterpenes from the bark of three new-caledonian *Cupaniopsis* species" *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 845–851.

28. Allouche, N. ; Morleo, B. ; Thoison, O. ; Dumontet, V. ; Nosjean, O. ; Guéritte, F. ; Sévenet, T. ; Litaudon, M., "Biologically active tetralones from New Caledonian *Zygogynum* spp." *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 1750–5.

29. Vasilakis, N. ; Weaver, S. C., *The history and evolution of human dengue emergence.* 08 ; Elsevier Inc. : jan. 2008 ; t. 72, p. 1–76.

30. Diallo, M. ; Sall, A. a. ; Moncayo, A. C. ; Ba, Y. ; Fernandez, Z. ; Ortiz, D. ; Coffey, L. L. ; Mathiot, C. ; Tesh, R. B. ; Weaver, S. C., "Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2005**, *73*, 445–9.

31. Wang, E ; Ni, H ; Xu, R ; Barrett, a. D. ; Watowich, S. J. ; Gubler, D. J. ; Weaver, S. C., "Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses." *J. Virol.*, **2000**, *74*, 3227–34.

32. Gubler, D. J., "Dengue and dengue hemorrhagic fever." *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, *11*, 480–96.

33. Rigau-Pérez, J. G., "The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1998**, *59*, 272–4.

34. Halstead, S. B., "Pathogenesis of dengue : challenges to molecular biology." *Science*, **1988**, *239*, 476–81.

35. WHO, *Dengue : Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control* ; World Health Organization : 2009.

36. Guzman, A. ; Istúriz, R. E., "Update on the global spread of dengue." *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, *36 Suppl 1*, S40–2.

37. Ooi, E. ; Gubler, D., "Dengue in Southeast Asia : epidemiological characteristics and strategic challenges in disease preventio" *Cad. Saúde Pública*, **2008**, *25*, S115–S124.

38. San Martín, J. L. ; Brathwaite, O. ; Zambrano, B. ; Solórzano, J. O. ; Bouckenooghe, A. ; Dayan, G. H. ; Guzmán, M. G., "The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades : a worrisome reality." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2010**, *82*, 128–35.

39. WHO *World Health Organisation. International Travel and Health [online]*, 2010.

40. WHO, *Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention and control.* WHO, éd. ; WHO : jan. 1997.

41. Deen, J. ; Harris, E. ; Wills, B. ; Balmaseda, A. ; Hammond, S. ; Rocha, C. ; Dung, N. ; Hung, N. ; Hien, T. ; Farrar, J., "The WHO dengue classification and case definitions : time for a reassessment" *Lancet*, **2006**, *368*, 170–173.

42. Bandyopadhyay, S. ; Lum, L. C. S. ; Kroeger, A., "Classifying dengue : a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever." *Trop. Med. Int. Health.*, **2006**, *11*, 1238–55.

43. Phuong, C. X. T. ; Nhan, N. T. ; Kneen, R. ; Thuy, P. T. T. ; Thien, C. van ; Nga, N. T. T. ; Thuy, T. T. ; Solomon, T. ; Stepniewska, K. ; Wills, B., "Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children : is the world health organization classification system helpful ?" *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2004**, *70*, 172–9.

44. WHO, *Dengue , Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome in the Context of the Integrated Management of Childhood Illness*, 2005.

45. Barniol, J. et al., "Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease : multi-centre study in 18 countries." *BMC Infect. Dis.*, **2011**, *11*, 106.

46. Lindenbach, B. ; Thiel, H.-J. ; Rice, C., "Flaviviridae : the viruses and their replication." *Fields Virology*, **2007**, 1101–1152.

47. Massé, N. ; Selisko, B ; Malet, H ; Peyrane, F ; Debarnot, C. ; Decroly, E. ; Benarroch, D. ; Egloff, M. ; Guillemot, J. ; Alvarez, K. ; Others, "Le virus de la dengue : cibles virales et antiviraux" *Virologie*, **2007**, *11*, 121–33.

48. Sampath, A. ; Padmanabhan, R, "Molecular targets for flavivirus drug discovery." *Antivir. Res.*, **2009**, *81*, 6–15.

49. Stevens, A. J. ; Gahan, M. E. ; Mahalingam, S. ; Keller, P. A., "The medicinal chemistry of dengue fever." *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 7911–26.

50. Ma, L. ; Jones, C. T. ; Groesch, T. D. ; Kuhn, R. J. ; Post, C. B., "Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold." *PNAS*, **2004**, *101*, 3414–9.

51. Mukhopadhyay, S. ; Kuhn, R. J. ; Rossmann, M. G., "A structural perspective of the flavivirus life cycle." *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, *3*, 13–22.

52. Chen, Y. ; Maguire, T. ; Hileman, R. E. ; Fromm, J. R. ; Esko, J. D. ; Linhardt, R. J. ; Marks, R. M., "Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate" *Nat. Med.*, **1997**, *3*, 866–871.

53. Chen, Y. C. ; Wang, S. Y. ; King, C. C., "Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism." *J. Virol.*, **1999**, *73*, 2650–7.

54. Navarro-Sanchez, E. ; Altmeyer, R. ; Amara, A. ; Schwartz, O. ; Fieschi, F. ; Virelizier, J.-L. ; Arenzana-Seisdedos, F. ; Desprès, P., "Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses." *EMBO Rep.*, **2003**, *4*, 723–8.

55. Tassaneetrithep, B. ; Burgess, T. H. ; Granelli-Piperno, A. ; Trumpfheller, C. ; Finke, J. ; Sun, W. ; Eller, M. a. ; Pattanapanyasat, K. ; Sarasombath, S. ; Birx, D. L. ; Steinman, R. M. ; Schlesinger, S. ; Marovich, M. a., "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells." *J. Exp. Med.*, **2003**, *197*, 823–9.

56. Jindadamrongwech, S ; Thepparit, C ; Smith, D. R., "Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2." *Arch. Virol*, **2004**, *149*, 915–27.

57. Watson, A. a. ; Lebedev, A. a. ; Hall, B. a. ; Fenton-May, A. E. ; Vagin, A. a. ; Dejnirattisai, W. ; Felce, J. ; Mongkolsapaya, J. ; Palma, A. S. ; Liu, Y. ; Feizi, T. ; Screaton, G. R. ; Murshudov, G. N. ; O'Callaghan, C. a., "Structural flexibility of the macrophage dengue virus receptor CLEC5A : Implications for ligand binding and signaling." *J. Biol. Chem.*, **2011**, 1–23.

58. Souza, D. G. ; Fagundes, C. T. ; Sousa, L. P. ; Amaral, F. a. ; Souza, R. S. ; Souza, A. L. ; Kroon, E. G. ; Sachs, D. ; Cunha, F. Q. ; Bukin, E. ; Atrasheuskaya, A. ; Ignatyev, G. ; Teixeira, M. M., "Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection." *PNAS*, **2009**, *106*, 14138–43.

59. Modis, Y. ; Ogata, S. ; Clements, D. ; Harrison, S. C., "A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein." *PNAS*, **2003**, *100*, 6986–91.

60. Wang, Q.-Y. ; Patel, S. J. ; Vangrevelinghe, E. ; Xu, H. Y. ; Rao, R. ; Jaber, D. ; Schul, W. ; Gu, F. ; Heudi, O. ; Ma, N. L. ; Poh, M. K. ; Phong, W. Y. ; Keller, T. H. ; Jacoby, E. ; Vasudevan, S. G., "A small-molecule dengue virus entry inhibitor." *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, *53*, 1823–31.

61. Poh, M. K. ; Yip, A. ; Zhang, S. ; Priestle, J. P. ; Ma, N. L. ; Smit, J. M. ; Wilschut, J. ; Shi, P.-Y. ; Wenk, M. R. ; Schul, W., "A small molecule fusion inhibitor of dengue virus." *Antivir. Res.*, **2009**, *84*, 260–6.

62. Yennamalli, R. ; Subbarao, N. ; Kampmann, T. ; McGeary, R. P. ; Young, P. R. ; Kobe, B., "Identification of novel target sites and an inhibitor of the dengue virus E protein." *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **2009**, *23*, 333–41.

63. Marks, R. M. ; Lu, H ; Sundaresan, R ; Toida, T ; Suzuki, a ; Imanari, T ; Hernáiz, M. J. ; Linhardt, R. J., "Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin : assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors." *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2178–87.

64. Lee, E. ; Pavy, M. ; Young, N. ; Freeman, C. ; Lobigs, M., "Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses." *Antivir. Res.*, **2006**, *69*, 31–8.

65. Liao, M. ; Kielian, M., "Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion." *J. Cell Biol.*, **2005**, *171*, 111–20.

66. Bray, B., "Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis" *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2*, 587–593.

67. Mackenzie, J. M. ; Jones, M. K. ; Young, P. R., "Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication." *Virology*, **1996**, *220*, 232–40.

68. Flamand, M ; Megret, F ; Mathieu, M ; Lepault, J ; Rey, F. a. ; Deubel, V, "Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion." *J. Virol.*, **1999**, *73*, 6104–10.

69. Alcon, S. ; Talarmin, A. ; Debruyne, M. ; Falconar, A. ; Deubel, V. ; Flamand, M., "Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections" *J. Clin. Microbiol.*, **2002**, *40*, 376.

70. Falgout, B ; Chanock, R ; Lai, C. J., "Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a." *J. Virol.*, **1989**, *63*, 1852–60.

71. Falgout, B ; Pethel, M ; Zhang, Y. M. ; Lai, C. J., "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." *J. Virol.*, **1991**, *65*, 2467–75.

72. Lescar, J. ; Luo, D. ; Xu, T. ; Sampath, A. ; Lim, S. P. ; Canard, B. ; Vasudevan, S. G., "Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses : the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target." *Antivir. Res.*, **2008**, *80*, 94–101.

73. Li, H ; Clum, S ; You, S ; Ebner, K. E. ; Padmanabhan, R, "The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids." *J. Virol.*, **1999**, *73*, 3108–16.

74. Xu, T. ; Sampath, A. ; Chao, A. ; Wen, D. ; Nanao, M. ; Chene, P. ; Vasudevan, S. ; Lescar, J., "Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 A" *J. Virol.*, **2005**, *79*, 10278.

75. Wu, J. ; Bera, A. ; Kuhn, R., "Structure of the Flavivirus helicase : implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing" *J. Virol.*, **2005**, *79*, 10268–10277.

76. Anderson, J. ; Schiffer, C. ; Lee, S.-K. ; Swanstrom, R., "Viral protease inhibitors." *Handbook of experimental pharmacology*, **2009**, 85–110.

77. Chatel-Chaix, L. ; Baril, M. ; Lamarre, D., "Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors : A Light at the End of the Tunnel" *Viruses*, **2010**, *2*, 1752–1765.

78. Wensing, A. M. J. ; Maarseveen, N. M. van ; Nijhuis, M., "Fifteen years of HIV Protease Inhibitors : raising the barrier to resistance." *Antivir. Res.*, **2010**, *85*, 59–74.

79. Yang, C.-C. ; Hsieh, Y.-C. ; Lee, S.-J. ; Wu, S.-H. ; Liao, C.-L. ; Tsao, C.-H. ; Chao, Y.-S. ; Chern, J.-H. ; Wu, C.-P. ; Yueh, A., "Novel Dengue Virus-Specific NS2B/NS3 Protease Inhibitor, BP2109, Discovered by a High-Throughput Screening Assay." *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, *55*, 229–238.

80. Tomlinson, S. M. ; Malmstrom, R. D. ; Russo, A. ; Mueller, N. ; Pang, Y.-P. ; Watowich, S. J., "Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors." *Antivir. Res.*, **2009**, *82*, 110–4.

81. Tomlinson, S. M. ; Watowich, S. J., "Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease." *Antivir. Res.*, **2011**, *89*, 127–35.

82. Kiat, T. S. ; Pippen, R. ; Yusof, R. ; Ibrahim, H. ; Khalid, N. ; Rahman, N. A., "Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3337–40.

83. Li, J. ; Lim, S. P. ; Beer, D. ; Patel, V. ; Wen, D. ; Tumanut, C. ; Tully, D. C. ; Williams, J. a. ; Jiricek, J. ; Priestle, J. P. ; Harris, J. L. ; Vasudevan, S. G., "Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries." *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 28766–74.

84. Yin, Z. ; Patel, S. J. ; Wang, W.-L. ; Wang, G. ; Chan, W.-L. ; Rao, K. R. R. ; Alam, J. ; Jeyaraj, D. a. ; Ngew, X. ; Patel, V. ; Beer, D. ; Lim, S. P. ; Vasudevan, S. G. ; Keller, T. H., "Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1 : Warhead." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 36–9.

85. Rawlinson, S. M. ; Pryor, M. J. ; Wright, P. J. ; Jans, D. A., "Dengue virus RNA polymerase NS5 : a potential therapeutic target ?" *Curr. Drug Targets*, **2006**, *7*, 1623–38.

86. Perera, R. ; Kuhn, R. J., "Structural proteomics of dengue virus." *Curr. Opin. Microbiol.*, **2008**, *11*, 369–77.

87. Yap, T. L. ; Xu, T. ; Chen, Y.-L. ; Malet, H. ; Egloff, M.-P. ; Canard, B. ; Vasudevan, S. G. ; Lescar, J., "Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution." *J. Virol.*, **2007**, *81*, 4753–65.

88. Cerutti, H. ; Casas-Mollano, J. A., "On the origin and functions of RNA-mediated silencing : from protists to man." *Curr. Genet.*, **2006**, *50*, 81–99.

89. De Clercq, E., "Recent highlights in the development of new antiviral drugs." *Curr. Opin. Microbiol.*, **2005**, *8*, 552–60.

90. De Francesco, R. ; Carfí, A., "Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus." *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2007**, *59*, 1242–62.

91. Olsen, D. ; Eldrup, A. ; Bartholomew, L. ; Bhat, B. ; Bosserman, M. ; Ceccacci, A. ; Colwell, L. ; Fay, J. ; Flores, O. ; Getty, K. ; Others, "A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties" *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 3944.

92. Yin, Z. et al., "An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus." *PNAS*, **2009**, *106*, 20435–9.

93. Latour, D. R. et al., "Biochemical characterization of the inhibition of the dengue virus RNA polymerase by beta-d-2'-ethynyl-7-deaza-adenosine triphosphate." *Antivir. Res.*, **2010**, *87*, 213–22.

94. YIN, Z. S. ; DURAISWAMY, J. S. ; CHEN, Yen, L. S. *Novel nucleosides analogues for the treatment of viral infections*, 2008.

95. Yin, Z. et al., "N-sulfonylanthranilic acid derivatives as allosteric inhibitors of dengue viral RNA-dependent RNA polymerase." *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 7934–7.

96. Niyomrattanakit, P. ; Chen, Y.-L. ; Dong, H. ; Yin, Z. ; Qing, M. ; Glickman, J. F. ; Lin, K. ; Mueller, D. ; Voshol, H. ; Lim, J. Y. H. ; Nilar, S. ; Keller, T. H. ; Shi, P.-Y., "Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel." *J. Virol.*, **2010**, *84*, 5678–5686.

97. Egloff, M.-P. ; Benarroch, D. ; Selisko, B. ; Romette, J.-L. ; Canard, B., "An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5 : crystal structure and functional characterization." *The EMBO journal*, **2002**, *21*, 2757–68.

98. Malet, H. ; Egloff, M.-P. ; Selisko, B. ; Butcher, R. E. ; Wright, P. J. ; Roberts, M. ; Gruez, A. ; Sulzenbacher, G. ; Vonrhein, C. ; Bricogne, G. ; Mackenzie, J. M. ; Khromykh, A. a. ; Davidson, A. D. ; Canard, B., "Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5." *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 10678–89.

99. Selisko, B. ; Dutartre, H. ; Guillemot, J.-C. ; Debarnot, C. ; Benarroch, D. ; Khromykh, A. ; Desprès, P. ; Egloff, M.-P. ; Canard, B., "Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases." *Virology*, **2006**, *351*, 145–58.

100. Judd, W. S. ; Campbell, C. S. ; Bouharmont, J. ; Kellogg, E. A. ; Evrard, C.-M. ; Stevens, P., *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*, De Boek, 2001.

101. Wiart, C., *Medicinal plants of Southeast Asia* ; Publications, P., éd., 2000.

102. Gottlieb, O., "Chemosystematics of the Lauraceae" *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 1537–1570.

103. Zschocke, S ; Van Staden, J., "*Cryptocarya* species–substitute plants for *Ocotea bullata* ? A pharmacological investigation in terms of cyclooxygenase-1 and-2 inhibition" *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, *71*, 473–478.

104. Kostermans, A. J. G. H., *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Lauracées* ; Le Muséum National d'Histoire Naturelle : 1974.

105. Sangat, H. M. ; Larashati, I., "Some Ethnophytomedical Aspects and Conservation Strategy of Several Medicinal Plants in Java, Indonesia" *Biodiversitas*, **2002**, *3*, 231–235.

106. Sehlapelo, B. ; Drewes, S., "Ocobullenone : a bicyclo octanoid neolignan from *Ocotea bullata*" *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 1352–1353.

107. Zschocke, S ; Drewes, S. E. ; Paulus, K ; Bauer, R ; Staden, J van, "Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves." *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, *71*, 219–30.

108. Bick, I. ; Sevenet, T. ; Sinchai, W. ; Skelton, B. ; White Allen, H., "Alkaloids of *Cryptocarya longifolia* : X-ray Crystal Structure of Thalifoline and Longifolonine" *Aust. J. Chem.*, **1981**, *34*, 477–481.

109. Bick, I. ; Preston, N. W. ; Potier., P., "Alcaloïdes de *Cryptocarya odorata* (Panch. et Seb.) Guillaum. (Lauraceae)" *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, *12*, 4596–4597.

110. Lee, S.-S. ; Liu, Y.-C. ; Chen, C.-H., "Neocaryachine, a New Pavine Alkaloid from *Cryptocarya chinensis*, and NMR Spectral Properties of Related Alkaloids" *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1267–1271.

111. Ewing, J. ; Hughes, G. K. ; Ritchie, E. ; Taylor, W. C., "An Alkaloid Related to Dehydrolaudanosoline" *Nature*, **1952**, *169*, 618–619.

112. Lee, S.-S. ; Chen, C.-K. ; Huang, F.-M. ; Chen, C.-H., "Two Dibenzopyrrocoline Alkaloids from *Litsea cubeba*" *J. Nat. Prod.*, **1996**, *59*, 80–82.

113. Qiu, S ; Liu, C ; Zhao, S ; Xia, Z ; Farnsworth, N ; Fong, H, "(1R, 2S)-(-)-mangochinine, a naturally-occurring dibenzopyrrocoline alkaloid from *Manglietia chingii*" *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 4167–4170.

114. Ewing, J ; Hughes, G. ; Ritchie, E ; Taylor, W., "The Alkaloids of *Cryptocarya bowiei* (Hook.) Druce" *Aust. J. Chem.*, **1953**, *6*, 78.

115. Lebœuf, M. ; Cavé, A. ; Ranaivo, A. ; Moskowitz, H., "Cryptowolinol et cryptowolidine, nouveaux alcaloïdes de type dibenzopyrrocoline" *Can. J. Chem.*, **1989**, *67*, 947–952.

116. Toribio, A. ; Bonfils, A. ; Delannay, E. ; Prost, E. ; Harakat, D ; Henon, E. ; Richard, B. ; Litaudon, M. ; Nuzillard, J. ; Renault, J., "Novel seco-dibenzopyrrocoline Alkaloid from *Cryptocarya oubatchensis*" *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3825–3828.

117. Lande, I. S. De la, "The alkaloids of *Cryptocarya pleurosperma*." *Aust. J. Exp. Biol. Med.*, **1948**, *26*, 181–7.

118. Medeiros, M. A. a. ; Nunes, X. P. ; Barbosa-Filho, J. M. ; Lemos, V. S. ; Pinho, J. F. ; Roman-Campos, D. ; Medeiros, I. a. de ; Araújo, D. A. M. ; Cruz, J. S., "*(S)*-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca(2+) channels." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **2009**, *379*, 115–25.

119. Awang, K. ; Hadi, A. ; Saidi, N. ; Mukhtar, M. ; Morita, H. ; Litaudon, M., "New phenantrene alkaloids from *Cryptocarya crassinervia*" *Fitoterapia*, **2008**, *79*, 308–310.

120. Chen, J. J. ; Chang, Y. L. ; Teng, C. M. ; Chen, I. S., "Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans from *Hernandia nymphaeifolia*." *Planta Medica*, **2000**, *66*, 251–6.

121. Morais, L. C. ; Barbosa-Filho, J. M. ; Almeida, R. N., "Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice." *J. Ethnopharmacol.*, **1998**, *62*, 57–61.

122. Zhao, Q. ; Zhao, Y. ; Wang, K., "Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen." *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *106*, 408–13.

123. Boustie, J ; Stigliani, J. L. ; Montanha, J ; Amoros, M ; Payard, M ; Girre, L, "Antipoliovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids." *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 480–4.

124. Gafner, S. ; Dietz, B. M. ; McPhail, K. L. ; Scott, I. M. ; Glinski, J. a. ; Russell, F. E. ; McCollom, M. M. ; Budzinski, J. W. ; Foster, B. C. ; Bergeron, C. ; Rhyu, M.-R. ; Bolton, J. L., "Alkaloids from *Eschscholzia californica* and their capacity to inhibit binding of [3H]8-Hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin to 5-HT1A receptors in Vitro." *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 432–5.

125. Wu, M.-H. ; Su, M.-J. ; Lee, S.-S. ; Lin, L.-T. ; Young, M.-L., "Electrophysiological basis for antiarrhytmic efficacy, positive inotropy and low proarrythmic potential of caryachine" *Brit. J. Pharmacol.*, **1995**, *116*, 3211–3218.

126. Chen, L ; Su, M. J. ; Wu, M. H. ; Lee, S. S., "Electrophysiological mechanisms for the antiarrhythmic action of (-)-caryachine in rat heart." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1996**, *27*, 740–8.

127. Yang, X. ; Shi, Q. ; Bastow, K. F. ; Lee, K.-H., "Antitumor agents. 274. A new synthetic strategy for E-ring SAR study of antofine and cryptopleurine analogues." *Organic Letters*, **2010**, *12*, 1416–9.

128. Staerk, D. ; Lykkeberg, A. K. ; Christensen, J. ; Budnik, B. a. ; Abe, F. ; Jaroszewski, J. W., "In vitro cytotoxic activity of phenanthroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells." *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1299–302.

129. Wang, K. ; Su, B. ; Wang, Z. ; Wu, M. ; Li, Z. ; Hu, Y. ; Fan, Z. ; Mi, N. ; Wang, Q., "Synthesis and antiviral activities of phenanthroindolizidine alkaloids and their derivatives." *J. Agric. Food. Chem.*, **2010**, *58*, 2703–9.

130. Min, H.-Y. ; Chung, H.-J. ; Kim, E.-H. ; Kim, S. ; Park, E.-J. ; Lee, S. K., "Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor-$\alpha$ (TNF-$\alpha$)-induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells." *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80*, 1356–64.

131. Bruneton, J., *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales* ; Doc, E. T. ., internationales, E. médicales, éds. ; Lavoisier : 2009.

132. Cavill, G. W. K. ; Clark, D. V. ; Whitfield, F. B., "Insect venoms, attractants, and repellents : massoialactone from two species if formicine ants, and some observations on constituents of the bark oil of Cryptocarya massoia" *Aust. J. Chem.*, **1968**, *21*, 2819–2823.

133. Siegfried E, D. ; Horn, M. M. ; Wijewardene, C. S., "alpha-pyrone From *Cryptocarya Latifolia* - A Structural Isomer Of Umuravumbolide" *Phytochemistry*, **1996**, *41*, 333–334.

134. Hlubucek, J. R. ; Robertson, A. V., "(+)-(5S)-gamma-lactone of 5-hydroxy-7-phenylhepta-2,6-dienoic acid, a natural product from *Cryptocarya caloneura* (Scheff.) Kostermans" *Aust. J. Chem.*, **1967**, *20*, 2199–2206.

135. Drewes, S. ; Horn, M. ; Shaw, R., "Alpha-Pyrones and their derivatives from two *Cryptocarya* species" *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 321–323.

136. Fu, T. ; Sévenet, A. ; Hamid, A ; Others, "Kurzilactone from *Cryptocarya kurzii*" *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 1272–1274.

137. Jiang, B, "Stereoselective synthesis of kurzilactone and determination of its absolute configuration" *Tetrahedron : Asymmetry*, **2001**, *12*, 2835–2843.

138. Sehlapelo, M. B., "A 6-sustituted 5,6-dihydro-alpha-pyrone from two species of *Cryptocarya*" *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 847–849.

139. Cavalheiro, A. ; Yoshida, M., "6-[omega-arylalkenyl]-5,6-dihydro-alpha-pyrones from *Cryptocarya moschata*" *Phytochemistry*, **2000**, *53*, 811–819.

140. Dumontet, V. ; Van Hung, N. ; Adeline, M. ; Riche, C. ; Chiaroni, A. ; Sévenet, T. ; Guéritte, F., "Cytotoxic Flavonoids and alpha-Pyrones from *Cryptocarya obovata*" *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 858–862.

141. Schmeda-Hirschmann, G. ; Astudillo, L. ; Bastida, J. ; Codina, C. ; Rojas De Arias, A. ; Ferreira, M. ; Inchaustti, A. ; Yaluff, G., "Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits" *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, *53*, 563–567.

142. Davis, R. A. ; Demirkiran, O. ; Sykes, M. L. ; Avery, V. M. ; Suraweera, L. ; Fechner, G. A. ; Quinn, R. J., "7',8'-Dihydroobolactone, a typanocidal alpha-pyrone from the rainforest tree *Cryptocarya obovata*." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 4057–9.

143. Sturgeon, C. M. ; Cinel, B. ; Díaz-Marrero, A. R. ; McHardy, L. M. ; Ngo, M. ; Andersen, R. J. ; Roberge, M., "Abrogation of ionizing radiation-induced G2 checkpoint and inhibition of nuclear export by *Cryptocarya* pyrones." *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2008**, *61*, 407–13.

144. Meragelman, T. L. ; Scudiero, D. A. ; Davis, R. E. ; Staudt, L. M. ; McCloud, T. G. ; Cardellina, J. H. ; Shoemaker, R. H., "Inhibitors of the NF-kappaB activation pathway from *Cryptocarya rugulosa*." *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 336–9.

145. Inayat-Hussain, S. H. ; Osman, a. B. ; Din, L. B. ; Ali, a. M. ; Snowden, R. T. ; MacFarlane, M ; Cain, K, "Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamin-induced apoptosis in human Jurkat T-cells." *FEBS Lett.*, **1999**, *456*, 379–83.

146. Inayat-Hussain, S, "Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamin in HL-60 leukemia cells" *Toxicol. in Vitro*, **2003**, *17*, 433–439.

147. Chien, A. L. T. ; Pihie, A. H. L., "Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of Bax in the human breast cancer cell line MCF-7." *J. Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, *36*, 269–74.

148. Fátima, A. D. ; Kohn, L. K. ; Carvalho, J. a. E. D. ; Pilli, R. a., "Cytotoxic activity of *(S)*-goniothalamin and analogues against human cancer cells." *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2006**, *14*, 622–31.

149. Govindachari, T. ; Parthasarathy, P., "Cryptocaryone, a novel 5',6'- dihydrochalcone from *Cryptocarya bourdilloni*" *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 3419 –3420.

150. Star, A, "Flavonoid and ceroptin pigments from frond exudates of *Pityrogramma triangularis*" *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 2275–2278.

151. Kurniadewi, F. ; Juliawaty, L. D. ; Syah, Y. M. ; Achmad, S. A. ; Hakim, E. H. ; Koyama, K. ; Kinoshita, K. ; Takahashi, K., "Phenolic compounds from *Cryptocarya konishii* : their cytotoxic and tyrosine kinase inhibitory properties." *J. Nat. Med.*, **2010**, *64*, 121–5.

152. Dumontet, V. ; Gaspard, C. ; Van Hung, N. ; Fahy, J. ; Tchertanov, L. ; Sévenet, T. ; Guéritte, F., "New cytotoxic flavonoids from *Cryptocarya infectoria*" *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 6189–6196.

153. Fu, X. ; Sévenet, T. ; Remy, F. ; Païs, M. ; Hadi, A. H. A. ; Zeng, L. M., "Flavanone and Chalcone Derivatives from *Cryptocarya kurzii*" *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 1153–1163.

154. Dumontet, V. *Etudes chimique et biologique de deux Lauraceae vietnamiennes du genre Cryptocarya : C. infectoria (Bl.) Miq. et C. obovata R. Br.* Thèse de doct., Université René Descartes Paris V, 2000.

155. Chou, T.-H. ; Chen, J.-J. ; Lee, S.-J. ; Chiang, M. Y. ; Yang, C.-W. ; Chen, I.-S., "Cytotoxic Flavonoids from the Leaves of *Cryptocarya chinensis*." *J. Nat. Prod.*, **2010**, *5*, 6–11.

156. Usman, H. ; Hakim, E. H. ; Harlim, T. ; Jalaluddin, M. N. ; Syah, Y. M. ; Achmad, S. A. ; Takayama, H., "Cytotoxic chalcones and flavanones from the tree bark of *Cryptocarya costata*." *Z. Naturforsch., C : Biosci.*, **2006**, *61*, 184–8.

157. Bandeira, K. F. ; Cavalheiro, A. J., "An LC–DAD Fingerprinting Method for Alkaloids, Flavonoids and Styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*" *Chromatographia*, **2009**, *70*, 1455–1460.

158. Chen, Y.-C. ; Kung, F.-L. ; Tsai, I.-L. ; Chou, T.-H. ; Chen, I.-S. ; Guh, J.-H., "Cryptocaryone, a natural dihydrochalcone, induces apoptosis in human androgen independent prostate cancer cells by death receptor clustering in lipid raft and nonraft compartments." *J. Urology*, **2010**, *183*, 2409–18.

159. Villanueva, V. ; Barbier, M ; Gonnet, M ; Lavie, P, "Les flavonoides de la propolis. isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique : la pinocembrine" *Ann. Inst. Pasteur*, **1970**, *118*, 84–87.

160. Bravo, J. A. ; Sauvain, M. ; Gimenez, A. ; Massiot, G. ; Deharo, E. ; Lavaud, C., "A contribution to attenuation of health problems in Bolivia : Bioactive natural compounds from native plants reported in traditional medecine." *Revista Boliviana de Quimica*, **2003**, *20*, 11–17.

161. Gao, M. ; Liu, R. ; Zhu, S.-Y. ; Du, G.-H., "Acute neurovascular unit protective action of pinocembrin against permanent cerebral ischemia in rats." *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2008**, *10*, 551–8.

162. Gao, M. ; Zhu, S.-Y. ; Tan, C.-B. ; Xu, B. ; Zhang, W.-C. ; Du, G.-H., "Pinocembrin protects the neurovascular unit by reducing inflammation and extracellular proteolysis in MCAO rats." *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2010**, *12*, 407–18.

163. Andersen, O. ; Markham, K., *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications* ; CRC Press : 2006.

164. Lewis, F. D. ; Zuo, X., "Activated decay pathways for planar vs twisted singlet phenylalkenes." *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8806–13.

165. Martin, N. H. ; Floyd, R. M. ; Woodcock, H. L. ; Huffman, S. ; Lee, C.-K., "Computation of through-space NMR shielding effects in aromatic ring pi-stacked complexes." *J. Mol. Graph. Model.*, **2008**, *26*, 1125–30.

166. Gaffield, W, "Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides : Determination of aglycone chirality" *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 4093–4108.

167. Slade, D. ; Ferreira, D. ; Marais, J. P. J., "Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids." *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2177–215.

168. Su, B.-N. ; Park, E. J. ; Vigo, J. S. ; Graham, J. G. ; Cabieses, F. ; Fong, H. H. ; Pezzuto, J. M. ; Kinghorn, A. D., "Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay" *Phytochemistry*, **2003**, *63*, 335–341.

169. Mislow, K. ; Glass, M. A. W. ; Moscowitz, A. ; Djerassi, C., "A generalization of the Octant rule" *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 2771–2772.

170. Weigang, O. E. ; Höhn, E. G., "A Generalized Theoretical Basis for the Octant Rule" *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 3673–3674.

171. Harada, N. ; Nakanishi, K., "Exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products" *Acc. Chem. Res.*, **1972**, *5*, 257–263.

172. Berova, N. ; Di Bari, L. ; Pescitelli, G., "Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds." *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 914–31.

173. Claps, M. ; Parrinello, N. ; Saá, C. ; Varela, J. a. ; Caccamese, S. ; Rosini, C., "Assignment of the absolute configuration of (+)-5,5',6,6'-tetrahydro-7,7'-spiro[7H-cyclopenta[b]pyridine], a new inherently chiral spiropyridine, by a nonempirical analysis of its circular dichroism spectrum" *Tetrahedron : Asymmetry*, **2006**, *17*, 1387–1393.

174. Giorgio, E. ; Tanaka, K. ; Ding, W. ; Krishnamurthy, G. ; Pitts, K. ; Ellestad, G. a. ; Rosini, C. ; Berova, N., "Theoretical simulation of the electronic circular dichroism spectrum of calicheamicin." *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 5072–9.

175. Caccamese, S. ; Barrano, G. B. ; Alajarin, M. ; Bonillo, B. ; Vidal, A. ; Bruno, G. ; Mazzeo, G. ; Rosini, C., "Determination of the absolute configuration of the enantiomers of dihydroquinolines, isolated by chiral chromatography, by non empirical analysis of circular dichroism spectra and X-ray analysis" *Tetrahedron : Asymmetry*, **2011**, *22*, 270–276.

176. Gross, E. ; Dobson, J. ; Petersilka, M., "Density functional theory of time-dependent phenomena" *Density Functional Theory II*, **1996**, *181*, 81–172.

177. Lee, C ; Yang, W ; Parr, R., "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density." *Phys. Rev. B : Condens. Matter*, **1988**, *37*, 785–789.

178. Becke, A. D., "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange" *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648.

179. Ding, Y. ; Li, X.-C. ; Ferreira, D., "Theoretical calculation of electronic circular dichroism of the rotationally restricted 3,8"-biflavonoid morelloflavone." *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 9010–7.

180. Ding, Y. ; Li, X.-C. ; Ferreira, D., "Theoretical calculation of electronic circular dichroism of a hexahydroxydiphenoyl-containing flavanone glycoside." *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 327–35.

181. Ding, Y. ; Li, X.-C. ; Ferreira, D., "4-Arylflavan-3-Ols As Proanthocyanidin Models : Absolute Configuration Via Density Functional Calculation of Electronic Circular Dichroism." *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 435–40.

182. Chang, G. ; Guida, W. C. ; Still, W. C., "An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space" *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4379–4386.

183. Polak, E. ; Ribiere, G., "Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées." *Rev. Fr. Inform. Rech. O.*, **1969**, *3*, 35–43.

184. Frisch, M. J. et al. *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

185. Bringmann, G. ; Bruhn, T. ; Maksimenka, K. ; Hemberger, Y., "The Assignment of Absolute Stereostructures through Quantum Chemical Circular Dichroism Calculations" *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2717–2727.

186. Mwine, J. T. ; Damme, P. V., "Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants ? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features" *J. Med. Plants Research*, **2011**, *5*, 652–662.

187. Webster, G. L., "Synopsis of the Genera and Suprageneric Taxa of Euphorbiaceae" *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1994**, *81*, 33.

188. Wurdack, K. ; Hoffmann, P. ; Chase, M., "Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences" *Am. J. Bot.*, **2005**, *92*, 1397.

189. Lovell, C., "Some biblical plants of dermatological importance" *Clin. Dermatol.*, **1998**, *16*, 33–40.

190. Sehgal, P. ; Khan, M ; Kumar, O ; Vijayaraghavan, R, "Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans." *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*, 3171–6.

191. Stirpe, F ; Pession-Brizzi, A ; Lorenzoni, E ; Strocchi, P ; Montanaro, L ; Sperti, S, "Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro." *Biochemical J.*, **1976**, *156*, 1–6.

192. Goel, G. ; Makkar, H. P. S. ; Francis, G. ; Becker, K., "Phorbol esters : structure, biological activity, and toxicity in animals." *Int. J. Toxicol.*, **2007**, *26*, 279–88.

193. Blumberg, P., "Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters : sixth Rhoads memorial award lecture" *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 1.

194. Beutler, J. A. ; Lindner, A. B. A. ; McCloud, T. G., "Further Studies on Phorbol Ester Bioactivity in the Euphorbiaceae" *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1996**, *83*, 530.

195. Chantaranothai, P., "The genus Trigonostemon (Euphorbiaceae) in Thailand." *Thai Forest Bulletin (Botany)*, **2005**, *33*, 21–31.

196. VEILLON, J.-M., "Présence du genre *Trigonostemon* Blume (Euphorbiaceae) en Nouvelle-Calédonie : description d'une nouvelle espèce T. cherrieri Veillon" *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. Section B, Adansonia*, **1992**, *14*, 55–60.

197. Kanchanapoom, T. ; Kasai, R. ; Chumsri, P. ; Kraisintu, K. ; Yamasaki, K., "Lotthanongine, an unprecedented flavonoidal indole alkaloid from the roots of Thai medicinal plant, *Trigonostemon reidioides*" *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 2941–2943.

198. Utsintong, M. ; Kaewnoi, A. ; Leelamanit, W. ; Olson, A. J. ; Vajragupta, O., "Rediocides A and G as potential antitoxins against cobra venom." *Chem. Biodivers.*, **2009**, *6*, 1404–14.

199. Li, S.-F. ; Di, Y.-T. ; He, H.-P. ; Zhang, Y. ; Wang, Y.-H. ; Yin, J.-L. ; Tan, C.-J. ; Li, S.-L. ; Hao, X.-J., "Trigonoines A and B, two novel alkaloids from the leaves of *Trigonostemon lii*" *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 3186–3188.

200. Kokpol, U. ; Thebpatiphat, S. ; Boonyaratavej, S. ; Chedchuskulcai, V. ; Ni, C.-z. ; Clardy, J. ; Chaichantipyuth, C. ; Chittawong, V. ; Miles, D. H., "Structure of Trigonostemone, a New Phenanthrenone from the Thai Plant *Trigonostemon reidioides*" *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1148–1151.

201. Liao, S.-G. ; Chen, H.-D. ; Yue, J.-M., "Plant orthoesters." *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 1092–140.

202. Hu, X.-J. ; Wang, Y.-H. ; Kong, L.-Y. ; He, H.-P. ; Gao, S. ; Liu, H.-Y. ; Ding, J. ; Xie, H. ; Di, Y.-T. ; Hao, X.-J., "New phenanthrenes from *Trigonostemon lii* Y.T. Chang" *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 2917–2919.

203. Tan, C.-J. ; Di, Y.-T. ; Wang, Y.-H. ; Zhang, Y. ; Si, Y.-K. ; Zhang, Q. ; Gao, S. ; Hu, X.-J. ; Fang, X. ; Li, S.-F. ; Hao, X.-J., "Three new indole alkaloids from *Trigonostemon lii*." *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 2370–3.

204. Kim, J. ; Movassaghi, M., "Concise Total Synthesis and Stereochemical Revision of (+)-Naseseazines A and B : Regioselective Arylative Dimerization of Diketopiperazine Alkaloids." *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *6*, 10768–10771.

205. Yin, S. ; Su, Z. ; Zhou, Z. ; Dong, L. ; Yue, J., "Antimicrobial diterpenes from *Trigonostemon chinensis*" *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1414–1417.

206. Shi, Q. ; Su, X. ; Kiyota, H., "Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*" *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 4295–4327.

207. Dong, S.-H. ; Zhang, C.-R. ; Xu, C.-H. ; Ding, J. ; Yue, J.-M., "Daphnane-Type Diterpenoids from *Trigonostemon howii*." *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 1255–61.

208. Chen, H.-D. ; Yang, S.-P. ; He, X.-F. ; Ai, J. ; Liu, Z.-K. ; Liu, H.-B. ; Geng, M.-Y. ; Yue, J.-M., "Trigochinins A-C : three new daphnane-type diterpenes from *Trigonostemon chinensis*." *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 1168–71.

209. Li, S.-F. ; Di, Y.-T. ; Li, S.-L. ; Zhang, Y. ; Yang, F.-M. ; Sun, Q.-Y. ; Simo, J. M. ; He, H.-P. ; Hao, X.-J., "Trigonosins A-F, daphnane diterpenoids from *Trigonostemon thyrsoideum*." *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 464–9.

210. Zhang, L. ; Luo, R. ; Wang, F. ; Dong, Z. ; Yang, L. ; Zheng, Y. ; Liu, J., "Daphnane diterpenoids isolated from *Trigonostemon thyrsoideum* as HIV-1 antivirals" *Phytochemistry*, **2010**, *71*, 1879–1883.

211. Lin, B.-D. ; Han, M.-L. ; Ji, Y.-C. ; Chen, H.-D. ; Yang, S.-P. ; Zhang, S. ; Geng, M.-Y. ; Yue, J.-M., "Trigoxyphins A-G : diterpenes from *Trigonostemon xyphophylloides*." *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1301–5.

212. Jayasuriya, H. ; Zink, D. L. ; Singh, S. B. ; Borris, R. P. ; Nanakorn, W. ; Beck, H. T. ; Balick, M. J. ; Goetz, M. A. ; Slayton, L. ; Gregory, L. ; Zakson-Aiken, M. ; Shoop, W. ; Singh, S. B., "Structure and Stereochemistry of Rediocide A, A Highly Modified Daphnane from *Trigonostemon reidioides* Exhibiting Potent Insecticidal Activity" *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4998–4999.

213. Walpole, C. S. ; Bevan, S ; Bloomfield, G ; Breckenridge, R ; James, I. F. ; Ritchie, T ; Szallasi, A ; Winter, J ; Wrigglesworth, R, "Similarities and differences in the structure-activity relationships of capsaicin and resiniferatoxin analogues." *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 2939–52.

214. Zhang, L. ; Luo, R.-H. ; Wang, F. ; Jiang, M.-Y. ; Dong, Z.-J. ; Yang, L.-M. ; Zheng, Y.-T. ; Liu, J.-K., "Highly functionalized daphnane diterpenoids from *Trigonostemon thyrsoideum*." *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 152–5.

215. Chen, H.-D. ; He, X.-F. ; Ai, J. ; Geng, M.-Y. ; Yue, J.-M., "Trigochilides A and B, two highly modified daphnane-type diterpenoids from *Trigonostemon chinensis*." *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 4080–3.

216. Jayasuriya, H. ; Zink, D. L. ; Borris, R. P. ; Nanakorn, W. ; Beck, H. T. ; Balick, M. J. ; Goetz, M. A. ; Gregory, L. ; Shoop, W. L. ; Singh, S. B., "Rediocides B-E, potent insecticides from *Trigonostemon reidioides*." *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 228–31.

217. Chen, H.-D. ; Yang, S.-P. ; He, X.-F. ; Liu, H.-B. ; Ding, J. ; Yue, J.-M., "Trigochinins D–I : six new daphnane-type diterpenoids from *Trigonostemon chinensis*" *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 5065–5070.

218. Zhu, Q. ; Tang, C.-P. ; Ke, C.-Q. ; Li, X.-Q. ; Liu, J. ; Gan, L.-S. ; Weiss, H.-C. ; Gesing, E.-R. ; Ye, Y., "Constituents of *Trigonostemon chinensis*." *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 40–4.

219. Hu, X.-J. ; Di, Y.-T. ; Wang, Y.-H. ; Kong, L.-Y. ; Gao, S. ; Li, C.-S. ; Liu, H.-Y. ; He, H.-P. ; Ding, J. ; Xie, H. ; Hao, X.-J., "Carboline alkaloids from *Trigonostemon lii*." *Planta Med.*, **2009**, *75*, 1157–61.

220. Soonthornchareonnon, N. ; Sakayarojkul, M. ; Isaka, M. ; Mahakittikun, V. ; Chuakul, W. ; Wongsinkongman, P., "Acaricidal Daphnane Diterpenoids from *Trigonostemon reidioides* (Kurz.) Craib. roots" *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, *53*, 241–243.

221. Tempeam, A. ; Thasana, N. ; Pavaro, C. ; Chuakul, W. ; Siripong, P. ; Ruchirawat, S., "A new cytotoxic daphnane diterpenoid, rediocide G, from *Trigonostemon reidioides*" *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, *53*, 1321–1323.

222. He, W. ; Cik, M. ; Appendino, G. ; Puyvelde, L. V. ; Leysen, J. E. ; De Kimpe, N., "Daphnane-type diterpene orthoesters and their biological activities." *Mini-Rev. Med. chem.*, **2002**, *2*, 185–200.

223. Stout, G. H. ; Balkenhol, W. J. ; Poling, M. ; Hickernell, G. L., "Isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of *Daphne* species" *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 1070–1071.

224. Ronlán, A ; Wickberg, B, "The structure of mezerein, a major toxic principle of *Daphne mezereum* L." *Tetrahedron Lett.*, **1970**, *11*, 4261–4.

225. Kupchan, S. M. ; Shizuri, Y. ; Murae, T. ; Sweeny, J. G. ; Haynes, H. R. ; Shen, M.-S. ; Barrick, J. C. ; Bryan, R. F. ; Van der Helm, D. ; Wu, K. K., "Gnidimacrin and gnidimacrin 20-palmitate, novel macrocyclic antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia subcordata*" *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 5719–5720.

226. Hergenhahn, M ; Adolf, W ; Hecker, E, "Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctcnal diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*" *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 1595–1598.

227. Zhan, Z.-J. ; Fan, C.-Q. ; Ding, J. ; Yue, J.-M., "Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa*." *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 645–55.

228. Connolly, J. D. ; Labbé, C. ; Rycroft, D. S., "Tetranortriterpenoids and related substances. Part 20. New tetranortriterpenoids from the seeds of *Chukrasia tabularis*(Meliaceae) ; simple esters of phragmalin and 12 ?-acetoxyphragmalin" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1978**, 285.

229. Akisanya, A. ; Bevan, C. W. L. ; Hirst, J. ; Halsall, T. G. ; Taylor, D. A. H., "758. West African timbers. Part III. Petroleum extracts from the genus Entandrophragma" *J. Chem. Soc.*, **1960**, 3827.

230. Cui, J. ; Deng, Z. ; Li, J. ; Fu, H. ; Proksch, P. ; Lin, W., "Phragmalin-type limonoids from the mangrove plant *Xylocarpus granatum*." *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2334–9.

231. Fan, C.-Q. ; Wang, X.-N. ; Yin, S. ; Zhang, C.-R. ; Wang, F.-D. ; Yue, J.-M., "Tabularisins A–D, phragmalin ortho esters with new skeleton isolated from the seeds of *Chukrasia tabularis*" *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6741–6747.

232. Capon, R. ; Macleod, J. ; Oelrichs, P., "Bryotoxins B and C, Toxic Bufadienolide Orthoacetates From the Flowers of *Bryophyllum tubiflorum* (Crassulaceae)" *Aust. J. Chem.*, **1986**, *39*, 1711–1715.

233. Elliger, C. A. ; Haddon, W. F. ; Waiss, A. C. ; Benson, M., "Petuniasterone N, an Unusual Ergostanoid from *Petunia* Species" *J. Nat. Prod.*, **1989**, *52*, 576–580.

234. Liu, Y. ; Qu, J. ; Yu, S. ; Tang, W. ; Liu, J. ; Hu, Y. ; Ma, S., "Nine novel C-21 steroidal glycosides substituted with orthoacetate from *Dregea sinensis* var. *corrugata*." *Steroids*, **2008**, *73*, 184–92.

235. Szallasi, A., "New Developments in the Medicinal Chemistry of Vanilloid TRPV1 and Related Receptors" *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011**, *11*, 2116–2117.

236. Appendino, G. ; Szallasi, A., "Euphorbium : Modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine" *Life Sci.*, **1997**, *60*, 681–696.

237. Szallasi, A, "Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper" *Neuroscience*, **1989**, *30*, 515–520.

238. Wender, P. A. ; Jesudason, C. D. ; Nakahira, H. ; Tamura, N. ; Tebbe, A. L. ; Ueno, Y., "The First Synthesis of a Daphnane Diterpene : The Enantiocontrolled Total Synthesis of (+)-Resiniferatoxin" *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 12976–12977.

239. Wahl, P ; Foged, C ; Tullin, S ; Thomsen, C, "Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist." *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *59*, 9–15.

240. Lim, K. S. ; Kang, D. W. ; Kim, Y. S. ; Kim, M. S. ; Park, S.-G. ; Choi, S. ; Pearce, L. V. ; Blumberg, P. M. ; Lee, J., "Receptor activity and conformational analysis of 5'-halogenated resiniferatoxin analogs as TRPV1 ligands." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 299–302.

241. Kupchan, S. ; Baxter, R., "Mezerein : antileukemic principle isolated from *Daphne mezereum* L." *Science*, **1975**, *187*, 652.

242. Zhang, S. ; Li, X. ; Zhang, F. ; Yang, P. ; Gao, X. ; Song, Q., "Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure-activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I." *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 3888–95.

243. Yoshida, M ; Feng, W ; Saijo, N ; Ikekawa, T, "Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* L." *Int. J. Cancer*, **1996**, *66*, 268–73.

244. Yoshida, M. ; Heike, Y. ; Ohno, S. ; Ikekawa, T. ; Wakasugi, H., "Involvement of PKC betaII in anti-proliferating action of a new antitumor compound gnidimacrin." *Int. J. Cancer*, **2003**, *105*, 601–6.

245. Wender, P. a. ; Buschmann, N. ; Cardin, N. B. ; Jones, L. R. ; Kan, C. ; Kee, J.-M. ; Kowalski, J. a. ; Longcore, K. E., "Gateway synthesis of daphnane congeners and their protein kinase C affinities and cell-growth activities" *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 615–619.

246. Hong, J.-Y. ; Nam, J.-W. ; Seo, E.-K. ; Lee, S. K., "Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*." *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, *58*, 234–7.

247. Gustafson, K. R. ; Cardellina, J. H. ; McMahon, J. B. ; Gulakowski, R. J. ; Ishitoya, J ; Szallasi, Z ; Lewin, N. E. ; Blumberg, P. M. ; Weislow, O. S. ; Beutler, J. a., "A nonpromoting phorbol from the samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1." *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 1978–86.

248. Kulkosky, J., "Prostratin : activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART" *Blood*, **2001**, *98*, 3006–3015.

249. 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.

250. Williams, S. a. ; Chen, L.-F. ; Kwon, H. ; Fenard, D. ; Bisgrove, D. ; Verdin, E. ; Greene, W. C., "Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB." *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 42008–17.

251. Hezareh, M. ; Moukil, M. A. ; Szanto, I. ; Pondarzewski, M. ; Mouche, S. ; Cherix, N. ; Brown, S. J. ; Carpentier, J.-L. ; Foti, M., "Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin : role of conventional and novel PKC isoforms." *Antiviral chem. chemoth.*, **2004**, *15*, 207–22.

252. Fujiwara, M ; Ijichi, K ; Tokuhisa, K ; Katsuura, K ; Shigeta, S ; Konno, K ; Wang, G. Y. ; Uemura, D ; Yokota, T ; Baba, M, "Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate." *Antimicrob. Agents. Ch.*, **1996**, *40*, 271–3.

253. Bocklandt, S ; Blumberg, P ; Hamer, D, "Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate" *Antivir. Res.*, **2003**, *59*, 89–98.

254. Asada, Y. ; Sukemori, A. ; Watanabe, T. ; Malla, K. J. ; Yoshikawa, T. ; Li, W. ; Koike, K. ; Chen, C.-H. ; Akiyama, T. ; Qian, K. ; Nakagawa-Goto, K. ; Morris-Natschke, S. L. ; Lee, K.-H., "Stelleralides A-C, Novel Potent Anti-HIV Daphnane-Type Diterpenoids from *Stellera chamaejasme* L." *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 2904–2907.

255. Huang, L. ; Ho, P. ; Yu, J. ; Zhu, L. ; Lee, K.-H. ; Chen, C.-H., "Picomolar Dichotomous Activity of Gnidimacrin Against HIV-1" *PLoS ONE*, **2011**, *6*, e26677.

256. Moellering, R. C., "Vancomycin : a 50-year reassessment." *Clin. Infect. Dis.*, **2006**, *42*, S3–4.

257. Harris, C. M. ; Kannan, R. ; Kopecka, H. ; Harris, T. M., "The role of the chlorine substituents in the antibiotic vancomycin : preparation and characterization of mono- and didechlorovancomycin" *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6652–6658.

258. Salamon, S. M., "Tetracyclines in ophthalmology." *Survey of Ophthalmology*, **1985**, *29*, 265–75.

259. Lee, M. ; Dunne, T. ; Siegel, M. ; Chang, C. ; Morton, G. ; Borders, D., "Calichemicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calichemicin. gamma. 1I" *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3464–3466.

260. Ellestad, G., "Structural and Conformational Features Relevant to the Anti-Tumor Activity of Calicheamicin" *Chirality*, **2011**, *671*, 660–671.

261. Feling, R. ; Buchanan, G. ; Mincer, T. ; Kauffman, C. ; Jensen, P. ; Fenical, W., "Salinosporamide A : a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 355–357.

262. Fenical, W. ; Jensen, P. ; Palladino, M. ; Lam, K. ; Lloyd, G. ; Potts, B., "Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052)" *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 2175–2180.

263. Gribble, G. W., *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*, First edit ; Springer : 2010, p. 613.

264. Bruno, M. ; Fazio, C. ; Piozzi, F. ; Savona, G. ; Rodríguez, B. ; Torre, M. C. de la, "Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium racemosum*" *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 505–507.

265. Han, L. ; Huang, X. ; Sattler, I. ; Dahse, H.-M. ; Fu, H. ; Lin, W. ; Grabley, S., "New diterpenoids from the marine mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*." *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1620–3.

266. Park, H, "Rakanmakilactones A–F, new cytotoxic sulfur-containing norditerpene dilactones from leaves of *Podocarpus macrophyllus* var. *maki*" *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 171–177.

267. Konishi, T. ; Konoshima, T. ; Fujiwara, Y. ; Kiyosawa, S. ; Miyahara, K. ; Nishi, M., "Stereostructures of New Labdane-Type Diterpenes, Excoecarins F, G1, and G2 from the Wood of *Excoecaria agallocha*" *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, *47*, 456–458.

268. Erickson, K. ; Beutler, J. ; Cardellina, J. ; McMahon, J. ; Newman, D. ; Boyd, M., "A novel phorbol ester from *Excoecaria agallocha*" *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 769–772.

269. Dong, C. ; Huang, F. ; Deng, H. ; Schaffrath, C. ; Spencer, J. ; O'Hagan, D. ; Naismith, J., "Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme" *Nature*, **2004**, *427*, 561–565.

270. Eustáquio, A. S.; Pojer, F.; Noel, J. P.; Moore, B. S., "Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase." *Nat. Chem. Biol.*, **2008**, *4*, 69–74.

271. Deng, H.; Cobb, S. L.; Gee, A. D.; Lockhart, A.; Martarello, L.; McGlinchey, R. P.; O'Hagan, D.; Onega, M., "Fluorinase mediated C-(18)F bond formation, an enzymatic tool for PET labelling." *Chem. Commun.*, **2006**, 652–4.

272. Runguphan, W.; Qu, X.; O'Connor, S. E., "Integrating carbon-halogen bond formation into medicinal plant metabolism." *Nature*, **2010**, *468*, 461–464.

273. Devappa, R. K.; Makkar, H. P. S.; Becker, K., "*Jatropha* Diterpenes : a Review" *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **2010**, *88*, 301–322.

274. Watts, V. S.; Goldstein, J. H., "A maximum overlap orbital calculation of 13C-H coupling constants in the vinyl halides" *Theor. Chim. Acta*, **1966**, *4*, 265–272.

275. Engvild, K. C., "Chlorine-containing natural compounds in higher plants" *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 781–791.

276. Vaillancourt, F. H.; Yeh, E.; Vosburg, D. a.; Garneau-Tsodikova, S.; Walsh, C. T., "Nature's inventory of halogenation catalysts : oxidative strategies predominate." *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3364–78.

277. Edwards, D.; Marquez, B.; Nogle, L.; McPhail, K.; Goeger, D.; Roberts, M.; Gerwick, W., "Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*" *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 817–833.

278. Gu, L.; Wang, B.; Kulkarni, A.; Geders, T. W.; Grindberg, R. V.; Gerwick, L.; Håkansson, K.; Wipf, P.; Smith, J. L.; Gerwick, W. H.; Sherman, D. H., "Metamorphic enzyme assembly in polyketide diversification." *Nature*, **2009**, *459*, 731–5.

279. Ueki, M.; Galonić, D. P.; Vaillancourt, F. H.; Garneau-Tsodikova, S.; Yeh, E.; Vosburg, D. a.; Schroeder, F. C.; Osada, H.; Walsh, C. T., "Enzymatic generation of the antimetabolite gamma,gamma-dichloroaminobutyrate by NRPS and mononuclear iron halogenase action in a streptomycete." *Chem. Biol.*, **2006**, *13*, 1183–91.

280. Vaillancourt, F. H.; Yin, J.; Walsh, C. T., "SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme $Fe^{II}$ $\alpha$-ketoglutarate- and $O_2$-dependent halogenase." *PNAS*, **2005**, *102*, 10111–6.

281. Vaillancourt, F. H.; Yeh, E.; Vosburg, D. a.; O'Connor, S. E.; Walsh, C. T., "Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis." *Nature*, **2005**, *436*, 1191–4.

282. Carolis, E. de; Luca, V. de, "2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes : biochemical characterization" *Phytochemistry*, **1994**, *36*.

283. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J., "The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin" *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1657–1666.

284. Ponder, J. W.; Richards, F. M., "An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules" *J. Comput. Chem*, **1987**, *8*, 1016–1024.

285. Allinger, N. L., "Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms" *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 8127–8134.

286. Mohamadi, F. ; Richards, N. G. J. ; Guida, W. C. ; Liskamp, R. ; Lipton, M. ; Caufield, C. ; Chang, G. ; Hendrickson, T. ; Still, W. C., "Macromodel : an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics" *J. Comput. Chem.*, **1990**, *11*, 440–467.

287. Bruhn, T. ; Hemberger, Y. ; Schaumlöffel, A. ; Bringmann, G., *SpecDis* ; University Würzburg : Würzburg : 2011.

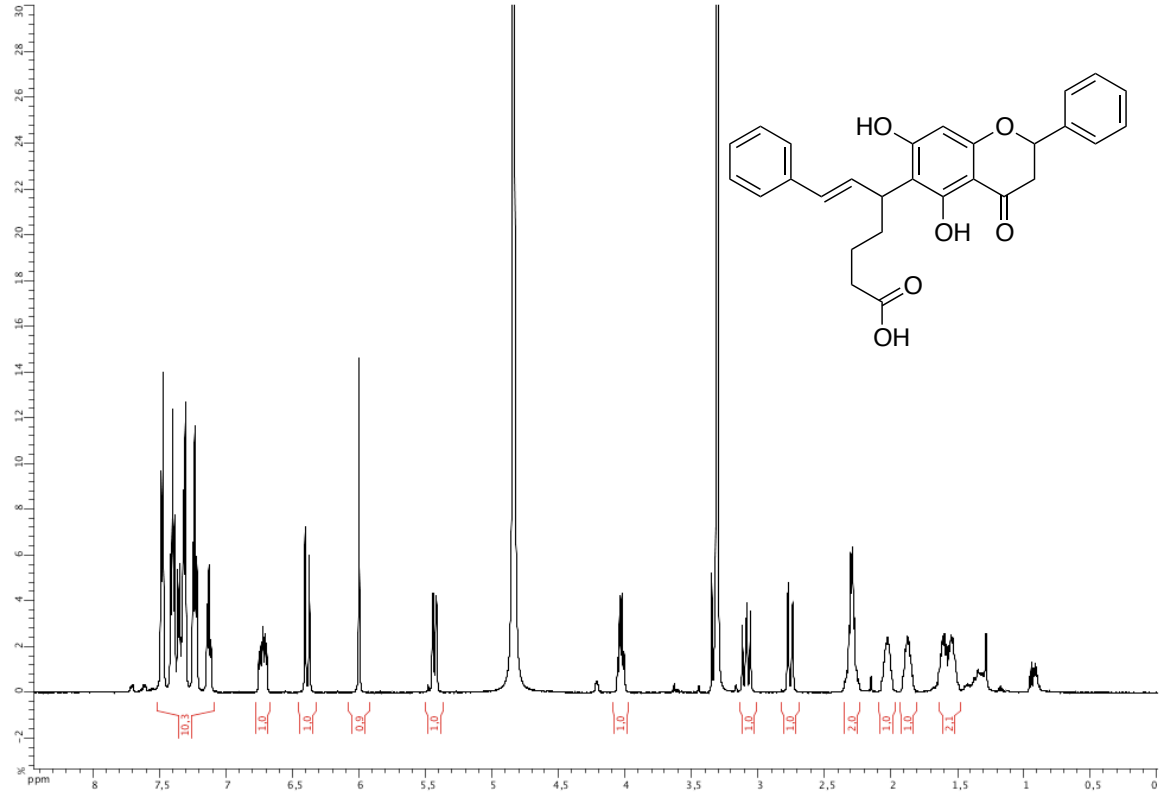
288. Tempête, C ; Werner, G. ; Favre, F ; Rojas, A ; Langlois, N, "In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyporothramycin B" *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30*, 647–650.

# Annexes

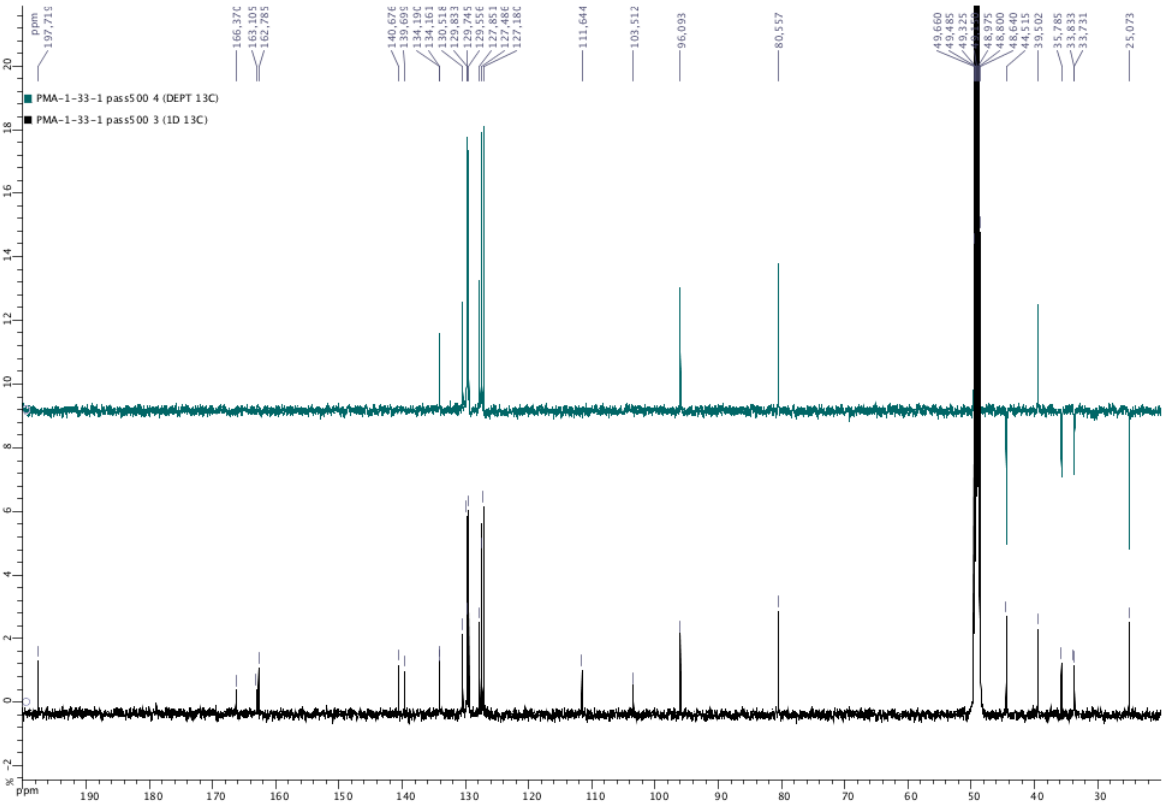
ANNEXE 1

# Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C et DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC et HMBC) de la chartacéone A (49)

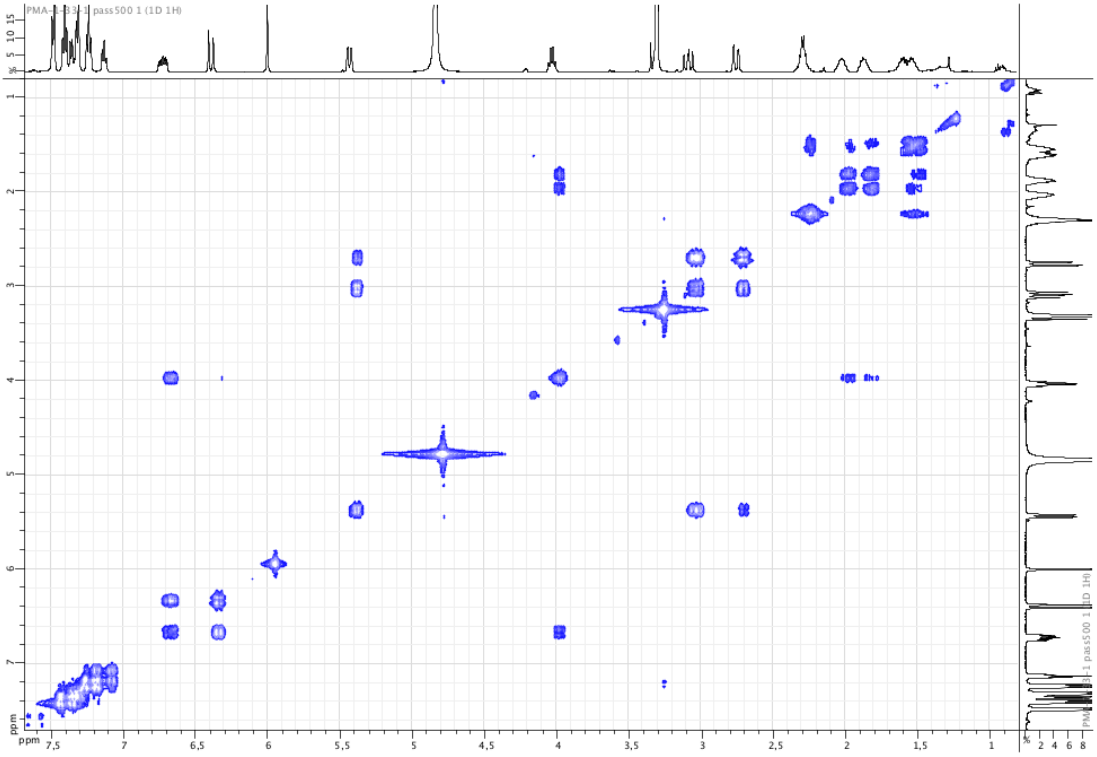
Spectre $^{1}$H de la chartacéone A (**49** ) (300 MHz, $CD_3OD$)



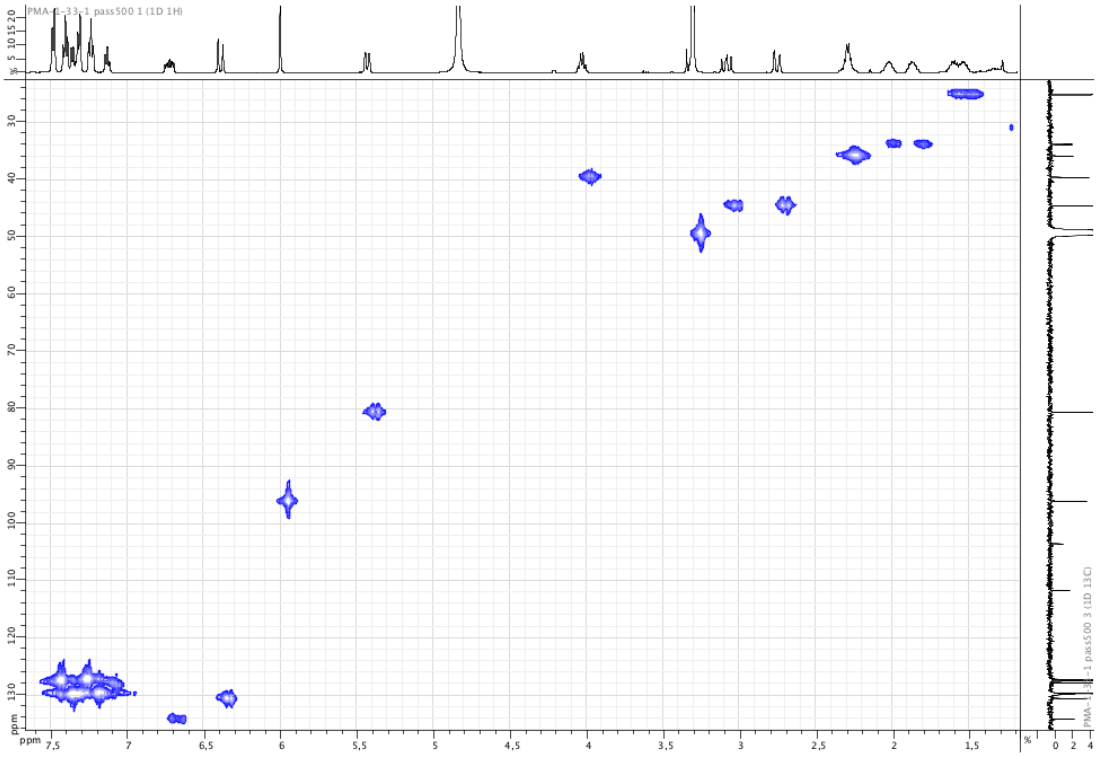

Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone A (**49**) (75 MHz, $CD_3OD$)



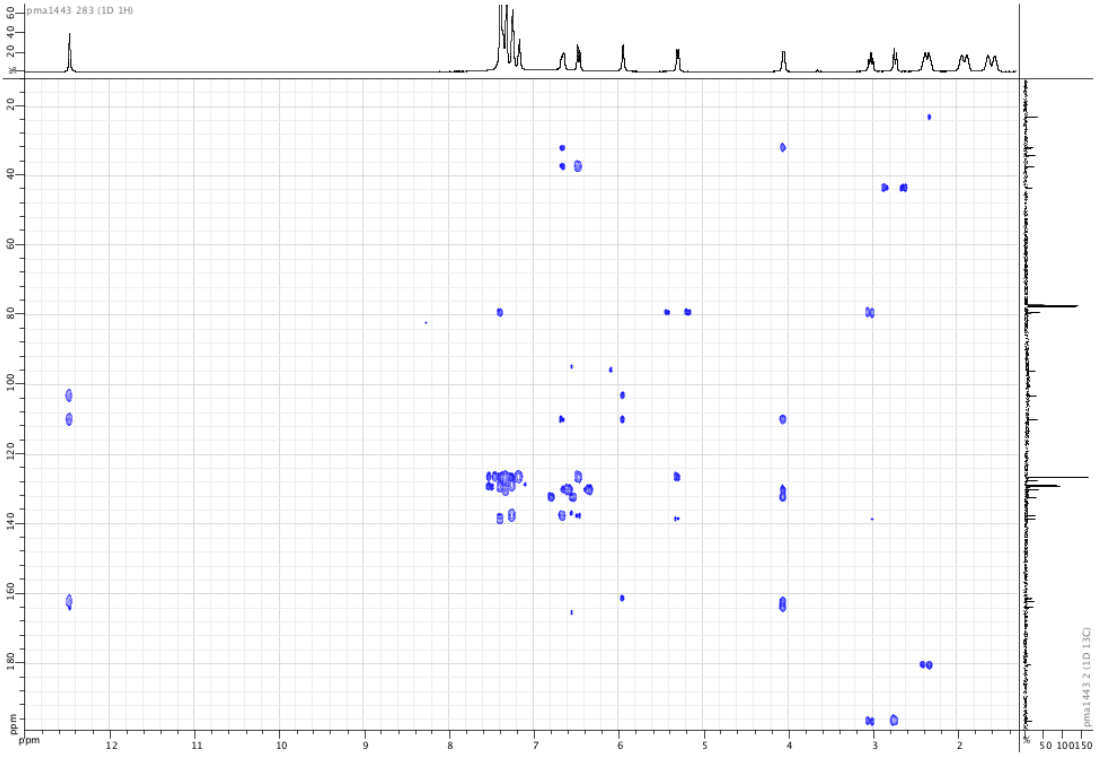
Spectre COSY de la chartacéone A (**49**) (300 MHz, $CD_3OD$)



Spectre HSQC de la chartacéone A (**49**) (300 MHz, $CD_3OD$)



Spectre HMBC de la chartacéone A (**49**) (600 MHz, $CDCl_3$)

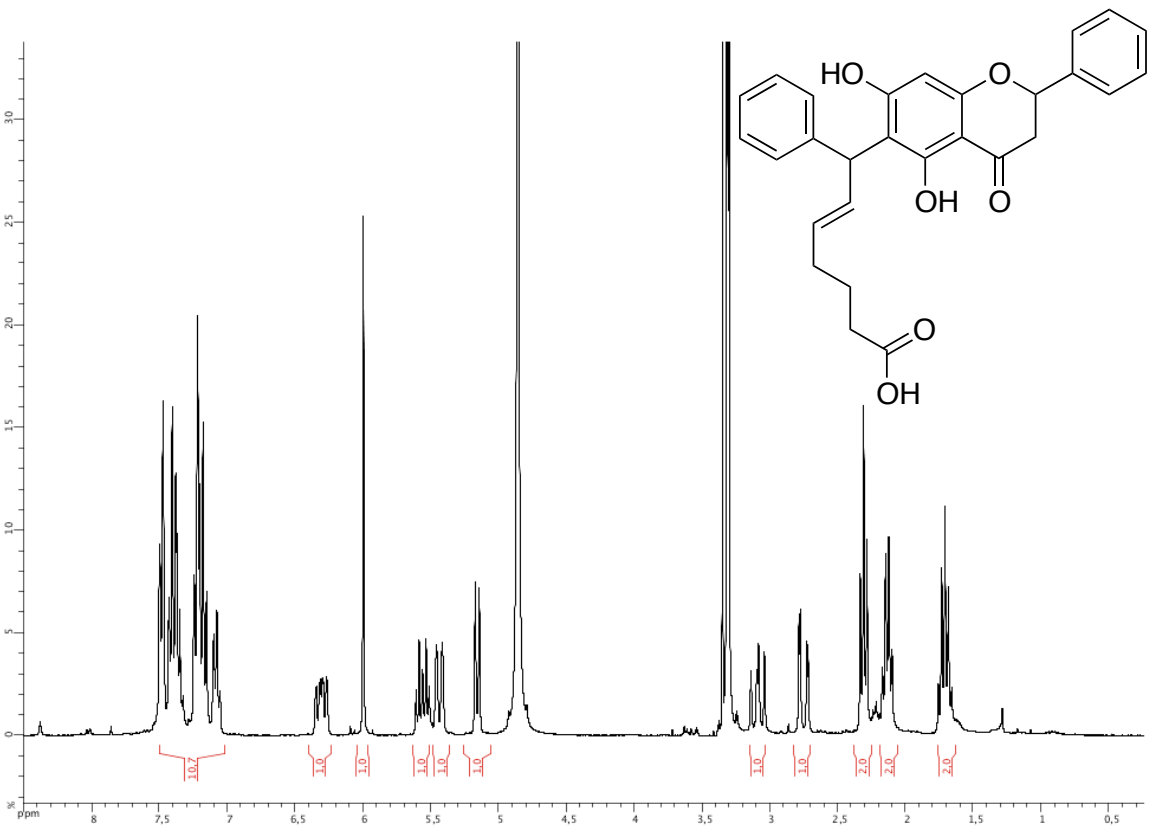


ANNEXE 2

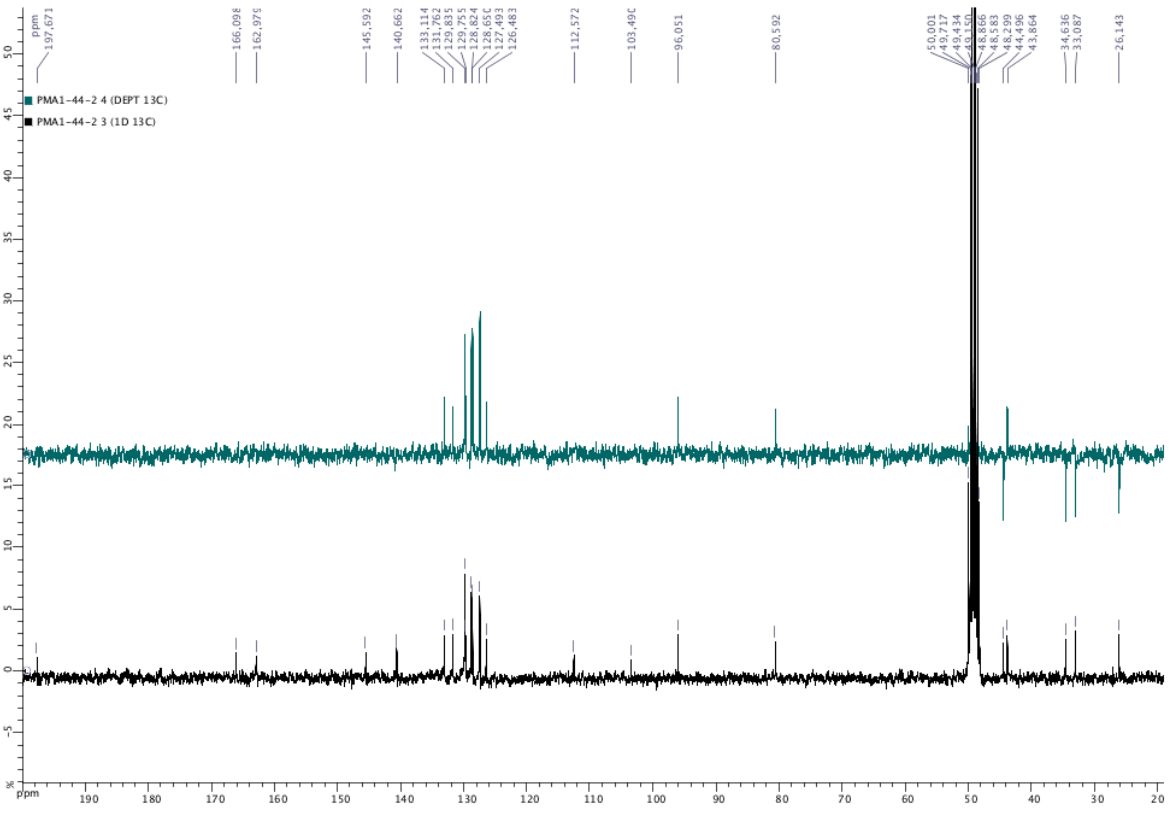
# Spectres RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ des chartacéones B-F (50-54)

# Chartacéone B (50)

Spectre $^{1}$H de la chartacéone B (**50**) (300 MHz, $CD_3OD$)

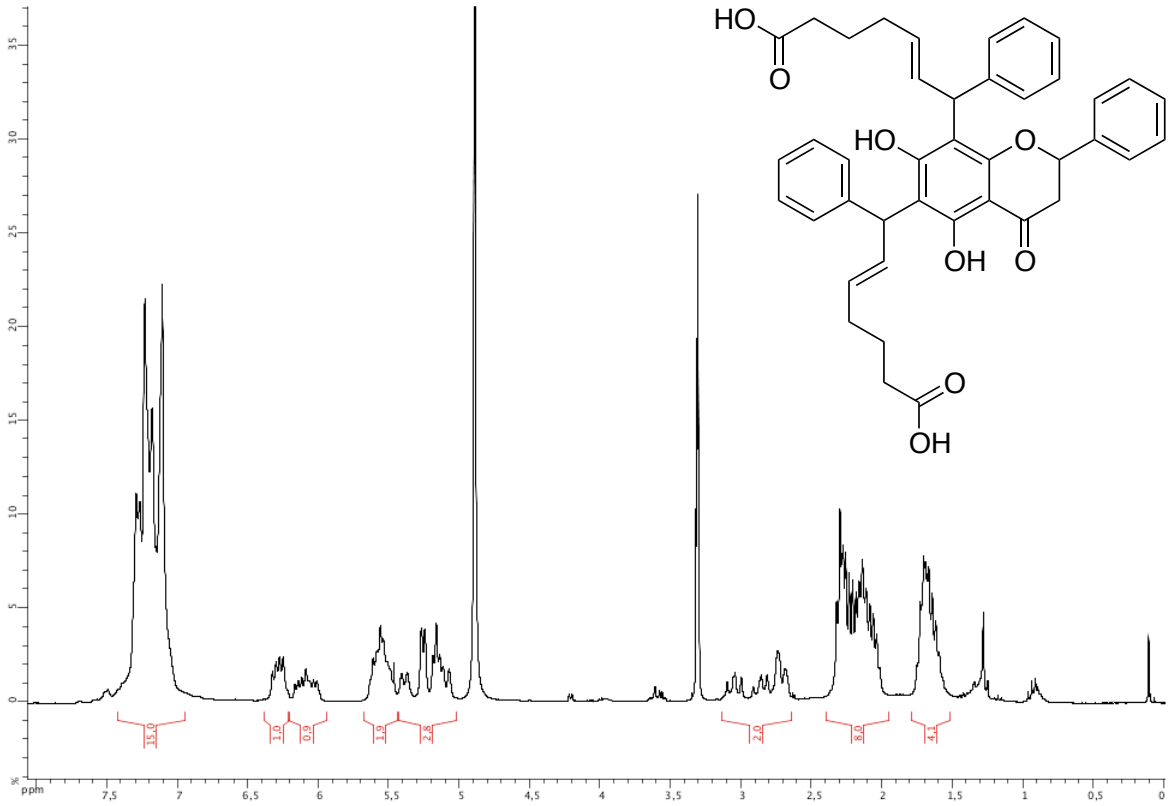



Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone B (**50**) (75 MHz, $CD_3OD$)

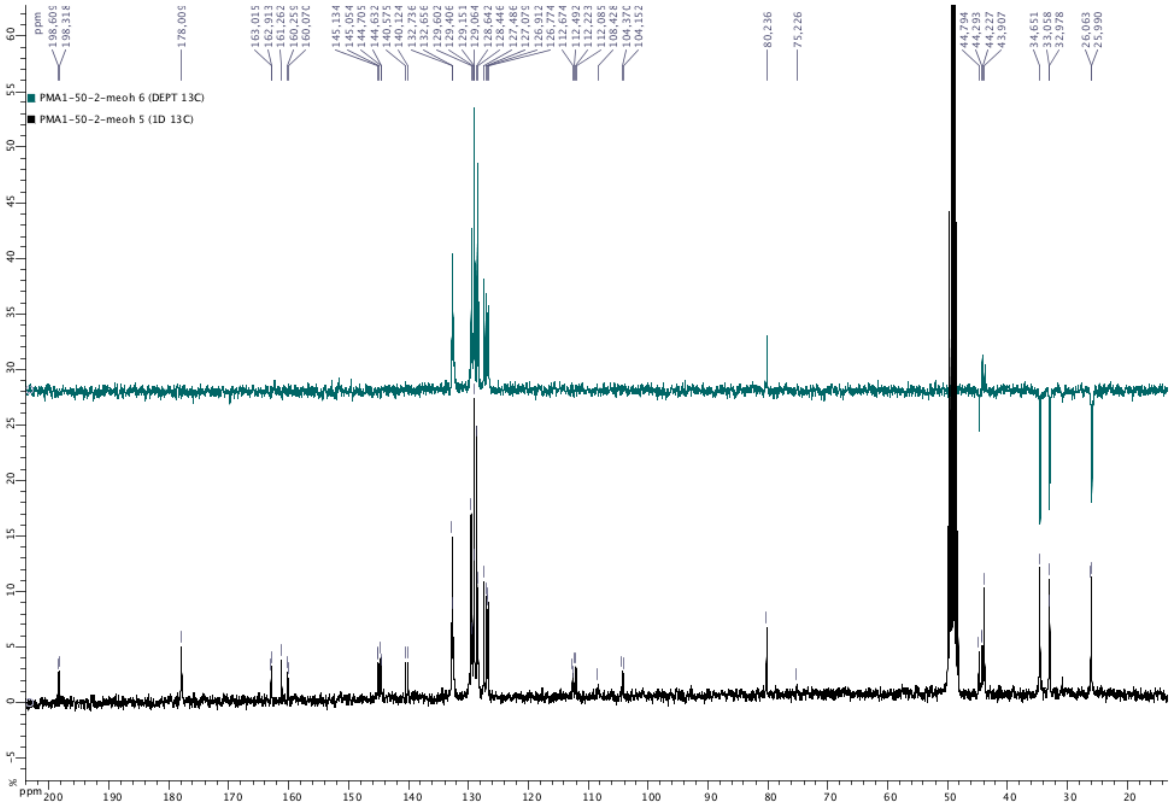


# Chartacéone C (51)

Spectre $^{1}$H de la chartacéone C (**51**) (300 MHz, $CD_3OD$)

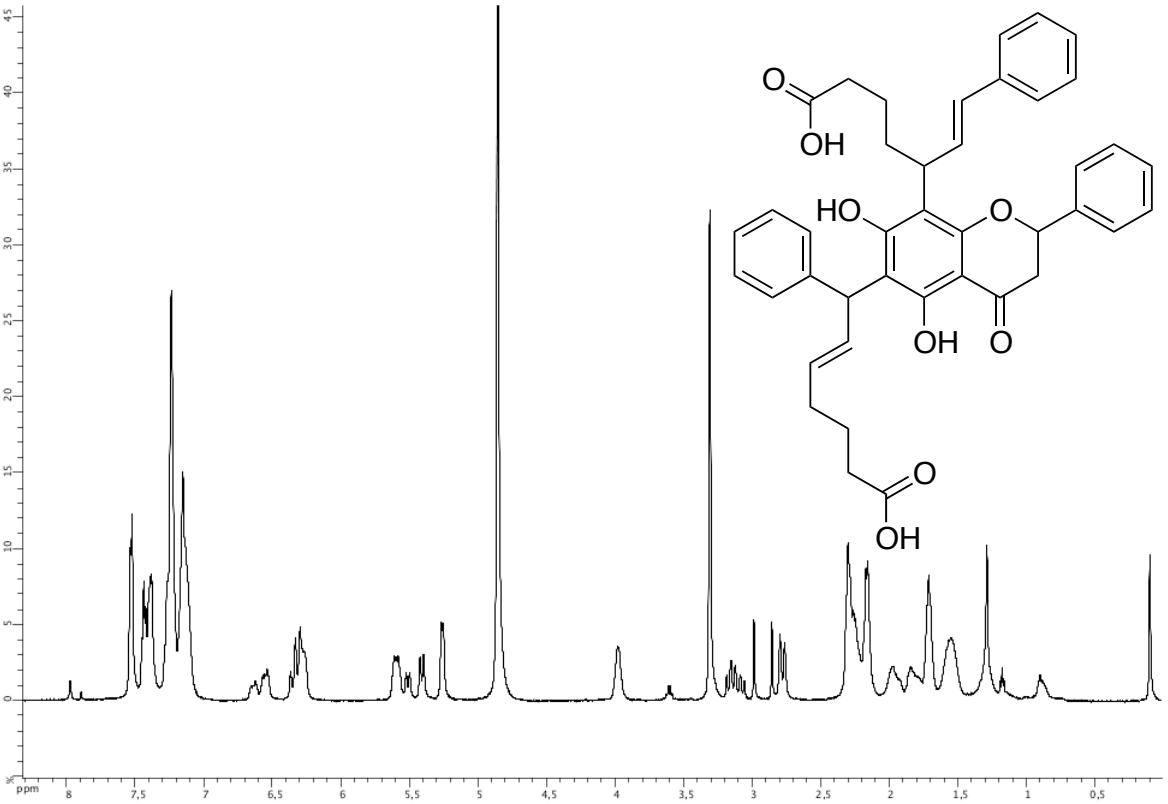



Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone C (**51**) (75 MHz, $CD_3OD$)

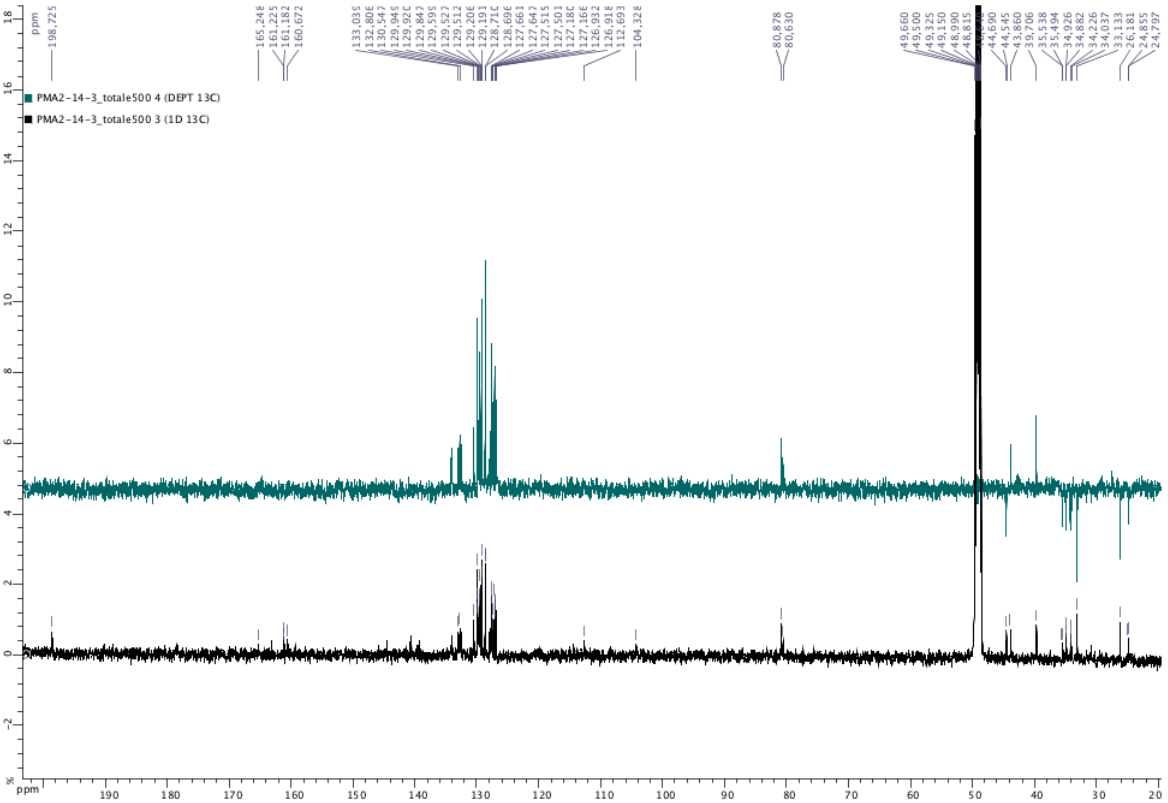


# Chartacéone D (52)

Spectre $^{1}$H de la chartacéone D (**52**) (300 MHz, $CD_3OD$)

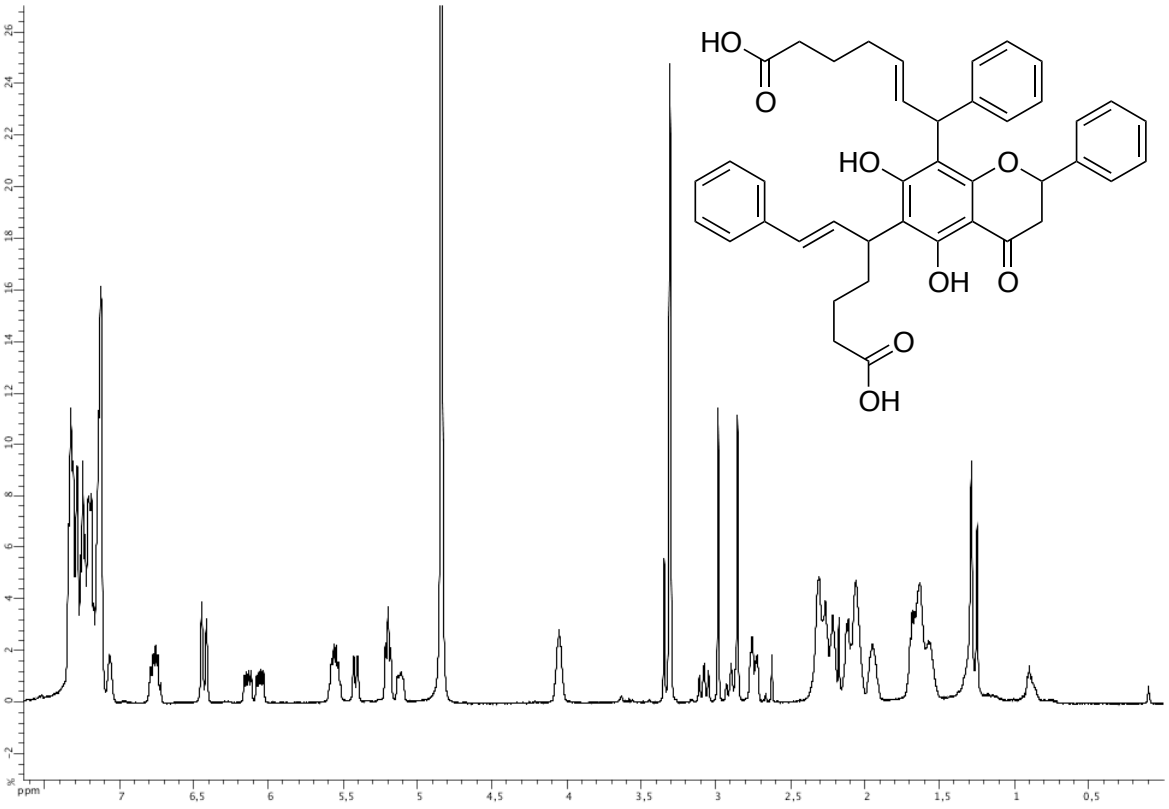



Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone D (**52**) (75 MHz, $CD_3OD$)

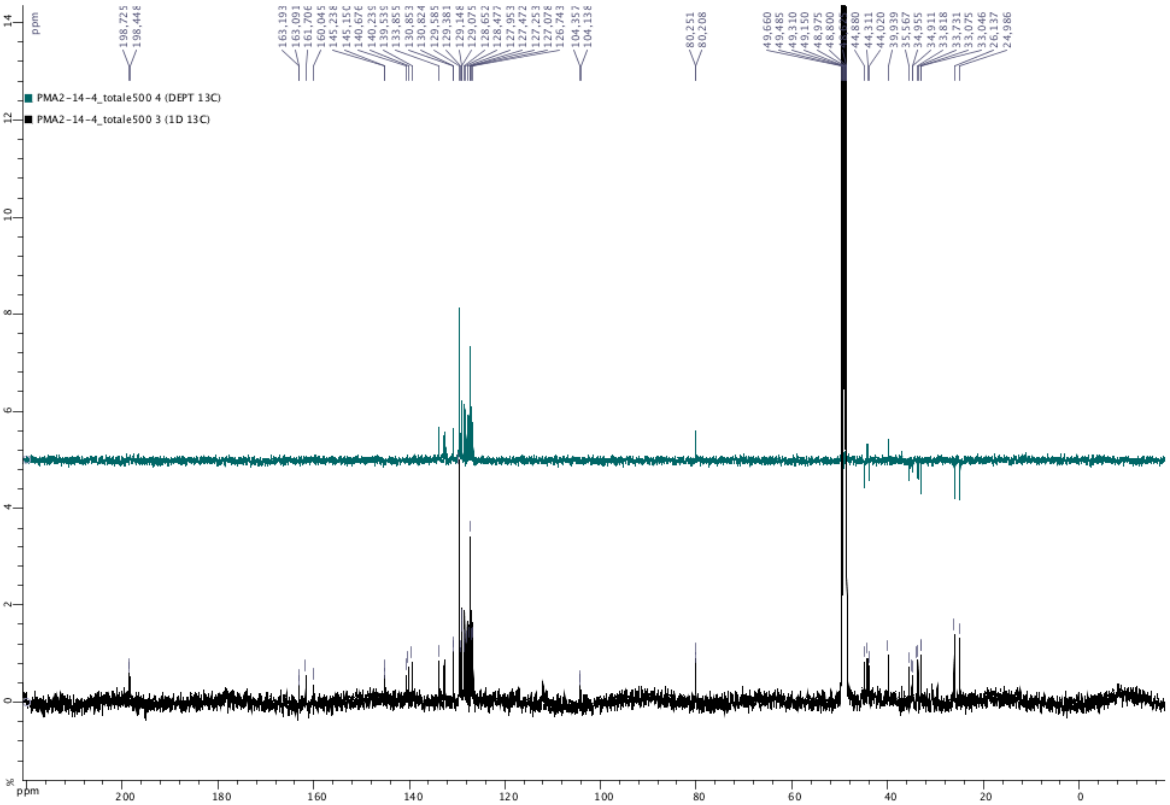


# Chartacéone E (53)

Spectre $^{1}$H de la chartacéone E (**53**) (300 MHz, $CD_3OD$)

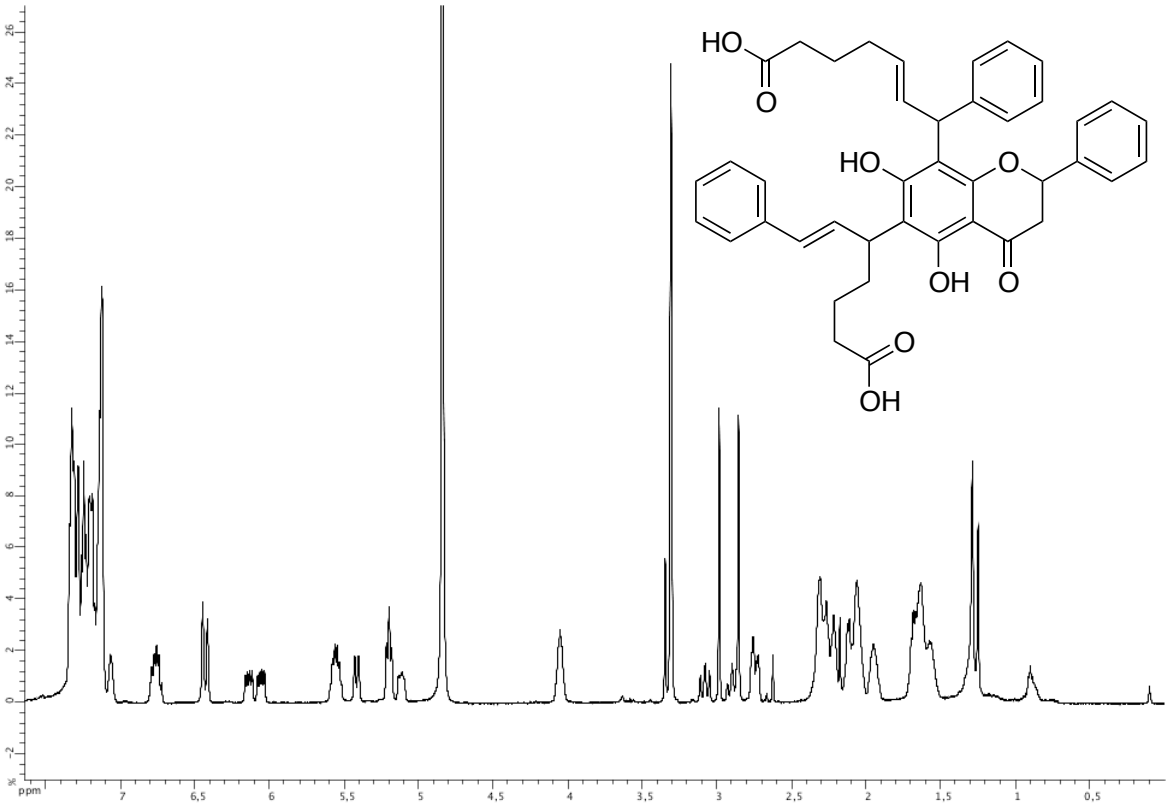



Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone E (**53**) (75 MHz, $CD_3OD$)

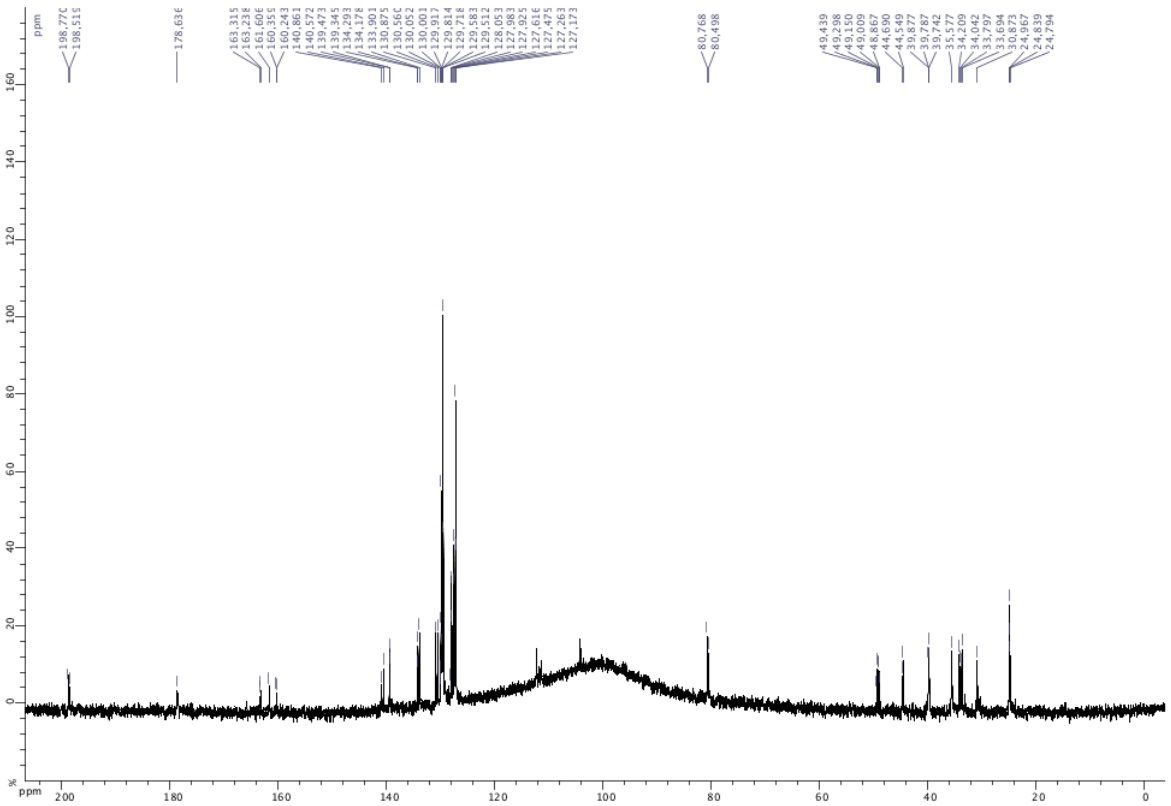


# Chartacéone F (54)

Spectre $^{1}$H de la chartacéone F (**54**) (300 MHz, $CD_3OD$)




Spectre $^{13}$C et DEPT-135 de la chartacéone F (**54**) (75 MHz, $CD_3OD$)



ANNEXE 3

# Spectres HMBC des chartacéones D et E (52 et 53)

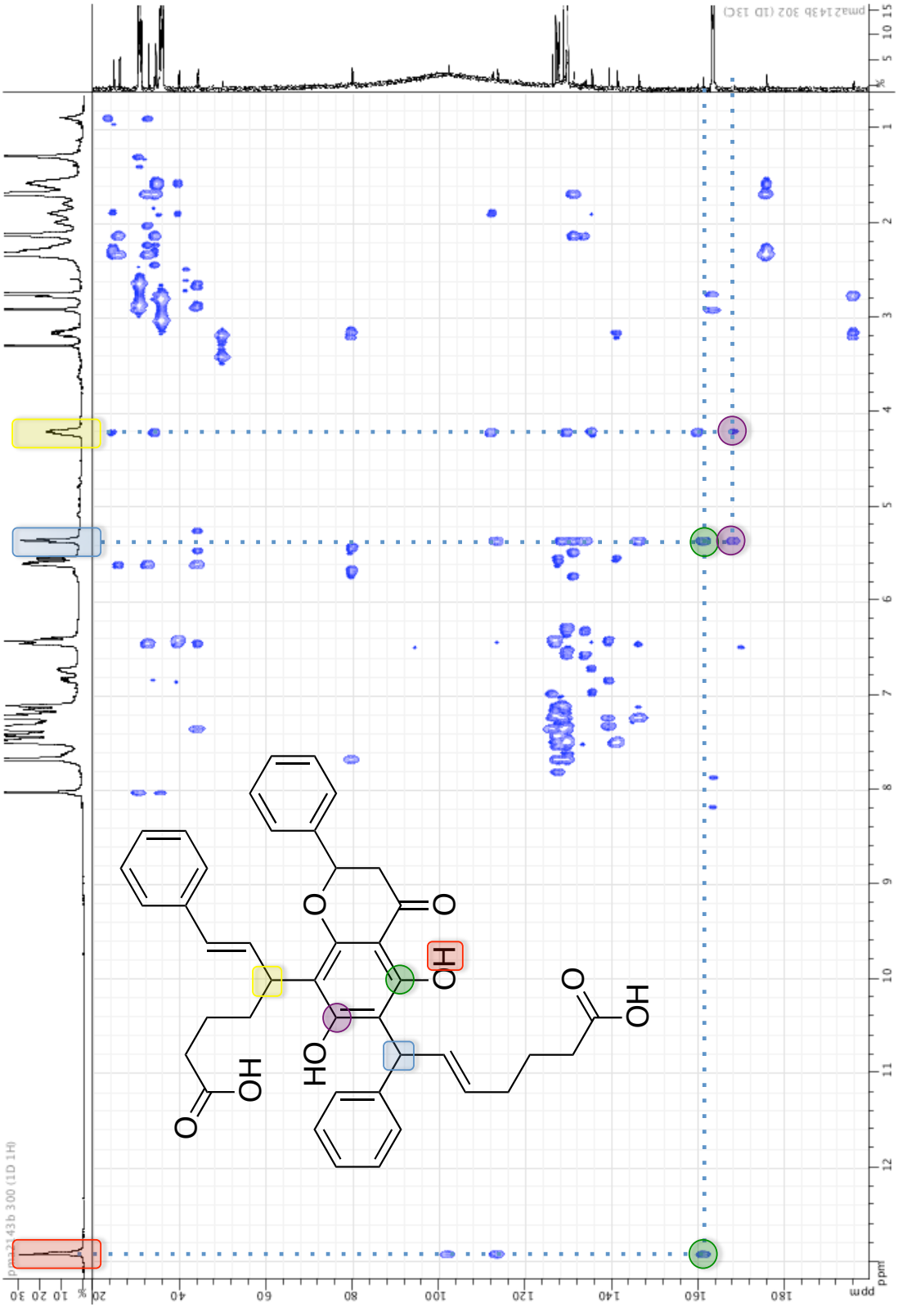
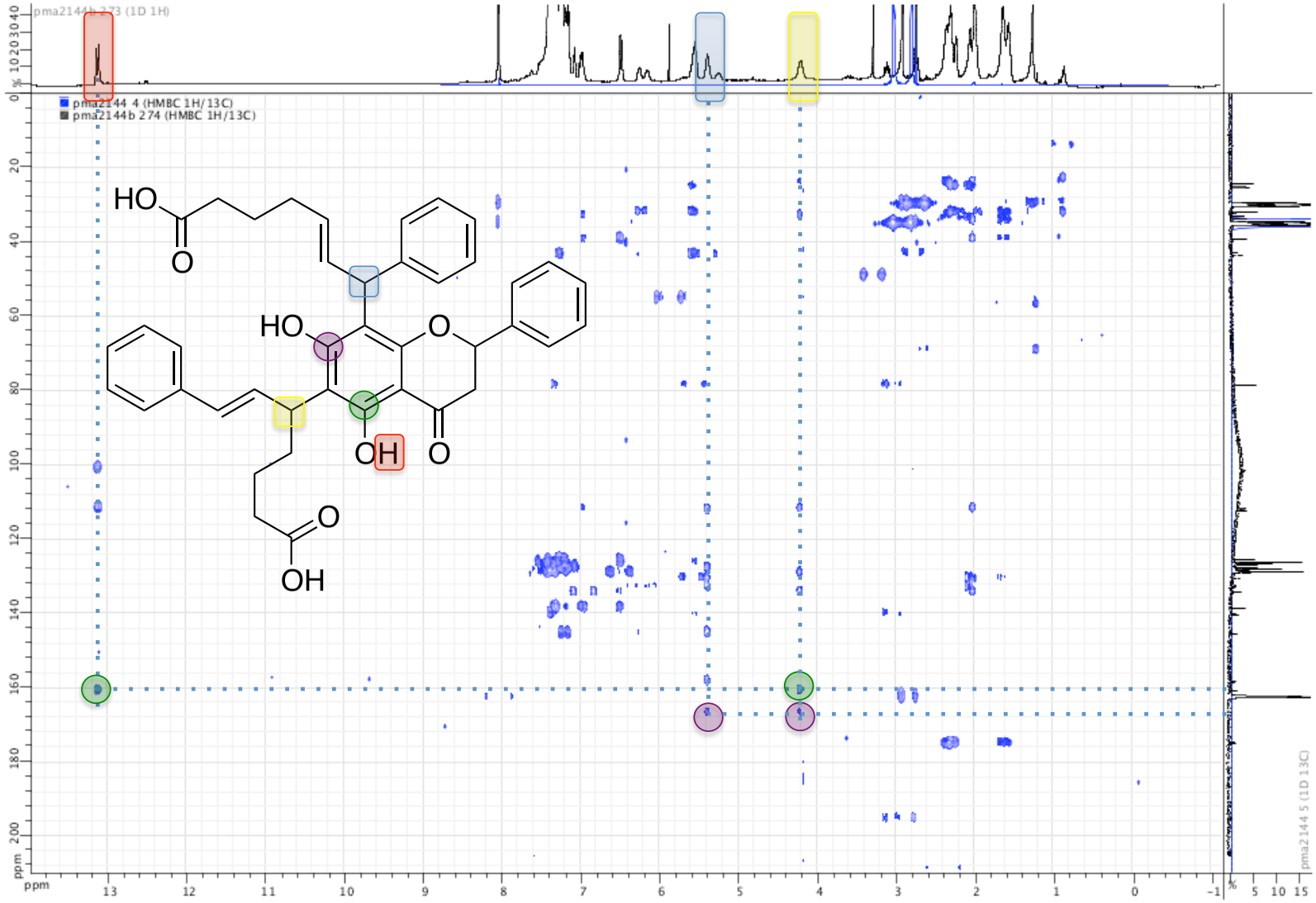



**Figure 205.** Spectre HMBC de la chartacéone D (**52**) (600 MHz, *d*-DMF)

**Figure 206.** Spectre HMBC de la chartacéone E (**53**) (600 MHz, *d*-DMF)



## Tableau 19. Données RMN $^{1}$H des chartacéones A1-A4 (55-58)[a] et B-F (50-54)[b]

| Position | **Chartacéone A1 -A4 (55-58)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) | **Chartacéone B (50)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) | **Chartacéone C (51)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) | **Chartacéone D (52)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) | **Chartacéone E (53)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) | **Chartacéone F (54)** $\delta_H$, m ($J$ en Hz) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2[c] | 5.43, dd (12.9, 3.1) | 5.44, dd (12.9, 3.1) | 5.09, d (13.0) | 5.51, d (12.9) | 5.12, m | 5.44, d (12.9) |
| | | | 5.39, d (12.7) | 5.41, d (12,9) | 5.42, d (13.0) | 5.33, d (12.9) |
| 3-$\alpha$ | 2.75, dd (17.1, 3.1) | 2.75, dd (17.1, 3.1) | 2.71, d (16.6) | 2.78, d (16.9) | 2.75, d (16.6) | 2.75, d (16.9) |
| 3-$\beta$[c] | 3.08, dd (17.1, 12.9) | 3.09, dd (17.1, 12.9) | 2.86, dd (16.6, 13.0) | 3.09, dd (16.9, 12.9) | 2.90, m | 3.03, dd (16.9, 12.9) |
| | | | 3.05, dd (16.6, 12.7) | 3.16, dd (16.9, 12.9) | 3.08, dd (16.6, 13.0) | 3.11, dd (16.9, 12.9) |
| 4 | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 6.00, s | 6.00. s | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - |
| 1′ | - | - | - | - | - | - |
| 2′ | 7.48, d (8.0) | 7.49, d (8.0) | 7.10 - 7.29, m | 7.53, d (7.0) | 7.07 - 7.33, m | 7.49, d (7.1) |
| 3′ | 7.35 – 7.43 | 7.32 - 7.44 | 7.10 - 7.29, m | 7.36 - 7.46, m | 7.07 - 7.33, m | 7.41, t (7.1) |
| 4′ | 7.35 – 7.43 | 7.32 - 7.44 | 7.10 - 7.29, m | 7.36 - 7.46, m | 7.07 - 7.33, m | 7.37, m |
| 5′ | 7.35 – 7.43 | 7.32 - 7.44 | 7.10 - 7.29, m | 7.36 - 7.46, m | 7.07 - 7.33, m | 7.41, t (7.1) |
| 6′ | 7.48, d (8.0) | 7.49, d (8.0) | 7.10 - 7.29, m | 7.53, d (7.0) | 7.07 - 7.33, m | 7.49, d (7.1) |
| 1″ | - | - | - | - | - | - |
| 2″ | 2.30, m | 2.31, t (7.2) | 2.15 - 2.36, m | 2.30, m | 2.37, m | 2.20 - 2.34, m |
| 3″ | 1.57, m | 1.71, qt (7.2) | 1.57 - 1.76, m | 1.71, m | 1.56 - 1.65, m | 1.50 - 1.67, m |
| 4″ | 1.87, m | 2.14, q (7.2) | 2.00 - 2.22, m | 2.17, m | 1.95 - 2.04, m | 1.91 - 2.08, m |
| | 2.03, m | | | | | |
| 5″ | 4.05, q (8.0) | 5.56, ddd (15.2, 8.5, 7.2) | 5.45 - 5.65, m | 5.60, m | 4.05, m | 4.06, m |
| 6″[c] | 6.74, dd (15.9, 8.5)[d] | 6.31, dd (15.2, 8.7) | 5.99 - 6.18, m | 6.28, m | 6.43, d (16) | 6.73 - 6.80, m |
| | 6.72, dd (15.9, 8.5)[e] | 6.30, dd (15.2, 8.7) | | | | |
| 7″ | 6.41, d (15.9) | 5.16, d (8.7) | 5.18, d (7.4) | 5.26, m | 6.8, m | 6.44, d (15.7) |
| 8″ | - | - | - | - | - | - |
| 9″ | 7.32, d (7.4) | 7.15 - 7.25 | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.25 - 7.34, m |
| 10″ | 7.24, t (7.4) | 7.15 - 7.25 | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.20 - 7.24, m |
| 11″ | 7.13, t (7.4) | 7.08, t (7.3) | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.08 - 7.16, m |
| 12″ | 7.24, t (7.4) | 7.15 - 7.25 | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.20 - 7.24, m |
| 13″ | 7.32, d (7.4) | 7.15 - 7.25 | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.25 - 7.34, m |
| 1‴ | | | - | - | - | - |
| 2‴ | | | 2.15 - 2.36, m | 2.25, m | 2.22, m | 2.20 - 2.34, m |
| 3‴ | | | 1.57 - 1.76, m | 1.55, m | 1.67, m | 1.50 - 1.67, m |
| 4‴ | | | 2.00 - 2.22, m | 1.85, m - 1.98, m | 2.06, m - 2.12, m | 1.70 - 1.90, m |
| 5‴ | | | 5.45 - 5.65, m | 3.98, m | 5.56, m | 4.01, m |
| 6‴[c] | | | 6.22 - 6.34, m | 6.55, m | 6.10, m | 6.56, dd (15.9, 7.6) |
| | | | | 6.63, m | | 6.65, dd (15.9, 7.6) |
| 7‴[c] | | | 5.26, d (7.5) | 6.32, d (16.8) | 5.2, m | 6.33, d (16.0) |
| | | | | 6.35, d (16.8) | | 6.36, d (16.0) |
| 8‴ | | | - | - | - | - |
| 9‴ | | | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.25 - 7.34, m |
| 10‴ | | | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.20 - 7.24, m |
| 11‴ | | | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.08 - 7.16, m |
| 12‴ | | | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.20 - 7.24, m |
| 13‴ | | | 7.10 - 7.29, m | 7.08 - 7.30, m | 7.07 - 7.33, m | 7.25 - 7.34, m |

[a] Données RMN des chartacéones A1-A4 (**55-58**) optiquement pures
[b] Données RMN des chartacéones B-F (**50-54**) en mélange diastéréomérique
[c] Possibilité de présence de deux signaux d'égales intensités pour les composés **50** à **54**
[d] Déplacements chimiques des chartacéones A1 (**55**) et A4 (**58**)
[e] Déplacements chimiques des chartacéones A2 (**56**) et A3 (**57**)

ANNEXE 4

# Données RMN $^{1}$H des chartacéones de *Cryptocarya chartacea*

Soulevez la page S. V. P.

**Tableau 20. Données RMN $^{13}C$ des chartacéones A1-A4 (55-58)[a] et B-F (50-54)[b]**

| Position | **A1 -A4 (55-58)** $\delta_C$ | **B (50)** $\delta_C$ | **C (51)** $\delta_C$ | **D (52)** $\delta_C$ | **E (53)** $\delta_C$ | **F (54)** $\delta_C$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2[c] | 80.6 | 80.6 | 80.2 | 80.6 et 80.9 | 80.2 | 80.5 et 80.8 |
| 3[c] | 44.5 | 44.5 | 44.8 | 44.5 et 44.7 | 44.2 et 44.8 | 44.6 et 44.7 |
| 4[c] | 197.7 | 197.7 | 198.3 et 198.6 | 198.5 et 198.7 | 198.4 et 198.7 | 198.5 et 198.8 |
| 5[c] | 163.1 | 163 | 161.3 | 161.1 et 161.2 | 161.7 | 161.5 et 161.6 |
| 6[c] | 111.6 | 112.6 | 112.1 et 112.2 | 112.7 | 112.5 | 112.3 |
| 7[c] | 166.4 | 166.1 | 162.9 et 163 | 163.2 | 163.1 et 163.2 | 163.2 et 163.3 |
| 8[c] | 96.1 | 96.1 | 112.5 et 112.7 | 111.7 | 111.8 | 111.5 et 111.8 |
| 9[c] | 162.8 | 162.8 | 160.1 et 160.3 | 160.5 et 160.7 | 160.1 | 160.3 et 160.4 |
| 10[c] | 103.5 | 103.5 | 104.2 et 104.4 | 104.3 | 104.1 et 104.4 | 104.1 et 104.3 |
| 1′[c] | 140.7 | 140.7 | 140.1 et 140.6 | 140.6 et 140.8 | 140.4 | 140.6 et 140.9 |
| 2′ | 127.5 | 127.5 | 126.8 -129.6 | 127.7 | 126.8 - 129.7 | 127.6 |
| 3′ | 129.8 | 129.8 | 126.8 -129.6 | 129.7 - 130 | 126.8 - 129.7 | 129.9 |
| 4′ | 129.7 | 129.7 | 126.8 -129.6 | 129.7 - 130 | 126.8 - 129.7 | 129.8 |
| 5′ | 129.8 | 129.8 | 126.8 -129.6 | 129.7 - 130 | 126.8 - 129.7 | 129.9 |
| 6′ | 127.5 | 127.5 | 126.8 -129.6 | 127.7 | 126.8 - 129.7 | 127.6 |
| 1″[c] | 178.5 | 178.1 | 178.0 | 178.4 | 178 et 178.6 | 178.6 |
| 2″ | 35.5 | 34.6 | 34.7 | 34.9 | 35.6 | 35.6 |
| 3″[c] | 25 | 26.1 | 26.0 et 26.1 | 26,2 | 25 | 24.8 et 25 |
| 4″[c] | 33.7[e] 33.8[d] | 33.1 | 33.0 et 33.1 | 33.1 | 33.7 et 33.8 | 33.7 et 33.8 |
| 5″ | 39.5 | 131.8 | 132.5 - 133.0 | 132.6 - 133 | 40 | 39.9 |
| 6″[c] | 134.1[d] 134.2[e] | 133.1 | 132.5 - 133.0 | 132.6 - 133 | 130.8 - 130.9 | 133.8 et 133.9 |
| 7″[c] | 130.5 | 43.9 | 44.2 et 44.3 | 43.9 | 133.9 | 130.9 |
| 8″[c] | 139.7 | 145.6 | 145.05 et 145.13 | 144.6 | 139.5 | 139.4 et 139.5 |
| 9″ | 127.2 | 128.7 | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.3 |
| 10″ | 129.6 | 128.8 | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 129.6 |
| 11″ | 127.9 | 126.5 | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.9 - 128.0 |
| 12″ | 129.6 | 128.8 | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 129.6 |
| 13″ | 127.2 | 128.7 | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.3 |
| 1‴[c] | | | 178.0 | 178.4 | 178 et 178.6 | 178.6 |
| 2‴ | | | 34.7 | 35.5 | 34.9 - 35 | 35.6 |
| 3‴[c] | | | 26.0 et 26.1 | 24.8 et 24.9 | 26,1 | 24.8 et 25 |
| 4‴[c] | | | 33.0 et 33.1 | 34.0 et 34.2 | 33 et 33.1 | 34.0 et 34.2 |
| 5‴[c] | | | 132.5 et 133.0 | 39.7 | 132.5 et 132.9 | 39.7 et 39.8 |
| 6‴[c] | | | 132.5 et 133.0 | 134.1 et 134.2 | 132.5 et 132.9 | 134.2 et 134.3 |
| 7‴ | | | 44.0 | 130.6 | 44.3 | 130.6 |
| 8‴[c] | | | 144.6 et 144.7 | 139.4 et 139.5 | 145.2 et 145.3 | 139.4 et 139.5 |
| 9‴ | | | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.3 |
| 10‴ | | | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 129.6 |
| 11‴ | | | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.9 - 128.0 |
| 12‴ | | | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 129.6 |
| 13‴ | | | 126.8 -129.6 | 127.0 - 130.0 | 126.8 - 129.7 | 127.3 |

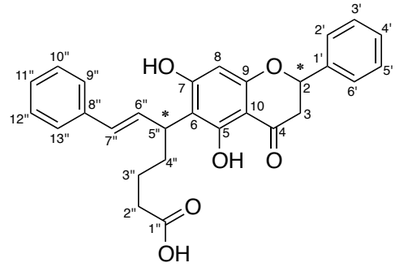
[a] Données RMN des chartacéones A1-A4 (**55-58**) optiquement pures
[b] Données RMN des chartacéones B-F (**50-54**) en mélange diastéréomérique
[c] Possibilité de présence de deux signaux d'égales intensités pour les composés **50** à **54**
[d] Déplacements chimiques des chartacéones A1 (**55**) et A4 (**58**)
[e] Déplacements chimiques des chartacéones A2 (**56**) et A3 (**57**)

ANNEXE 5

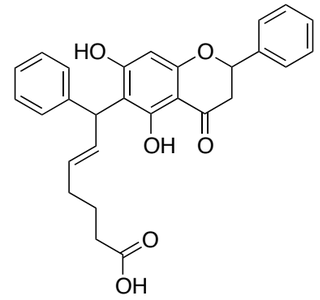
# Données RMN $^{13}$C des chartacéones de *Cryptocarya chartacea*

Soulevez la page S. V. P.

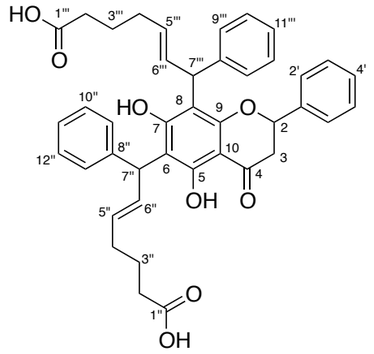
## Chartacéones isolées des écorces de *Cryptocarya chartacea*



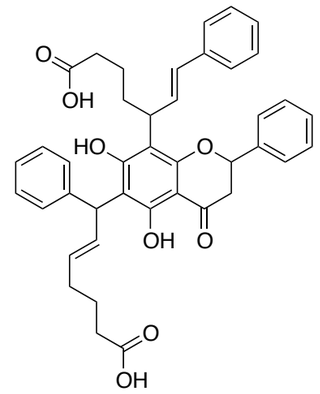

Chartacéone A (**49**)



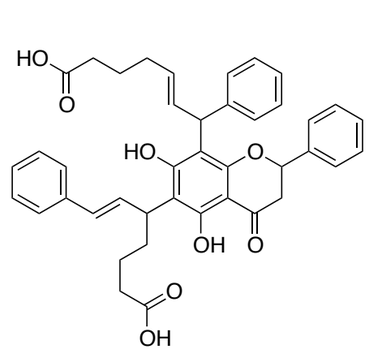

Chartacéone B (**50**)



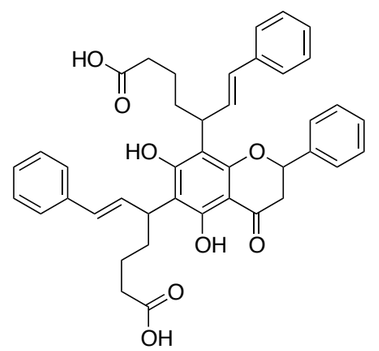

Chartacéone C (**51**)




Chartacéone D (**52**)




Chartacéone E (**53**)




Chartacéone F (**54**)

ANNEXE 6

# Chartacéones isolées des écorces de *Cryptocarya chartacea*

Soulevez la page S. V. P.

ANNEXE 7

# Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) de la trigocherrine A( 112)

**Figure 207.** Spectre $^{1}$H de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$)

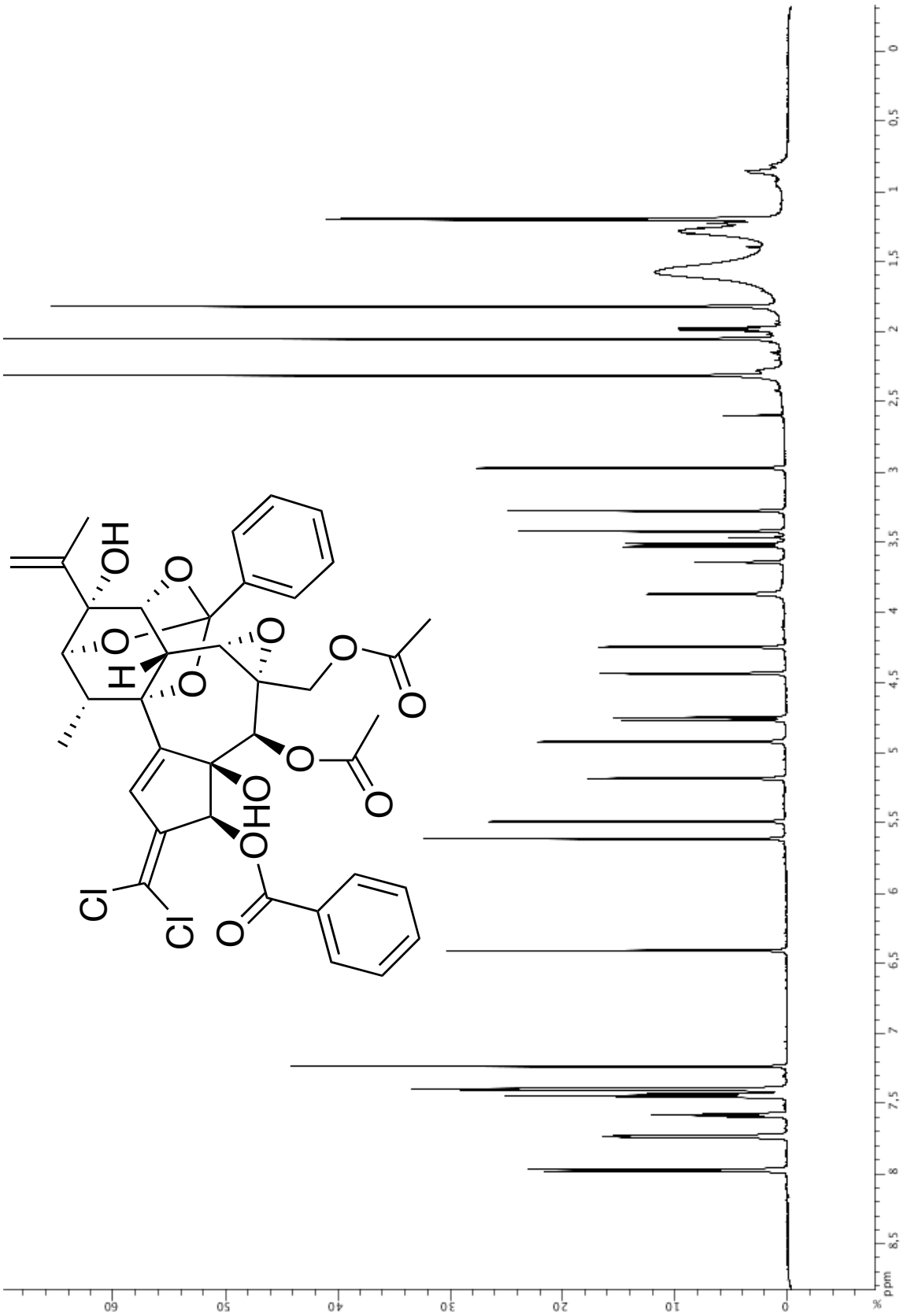


**Figure 208.** Spectre $^{13}C$ de la trigocherrine A **112** (150 MHz, $CDCl_3$)

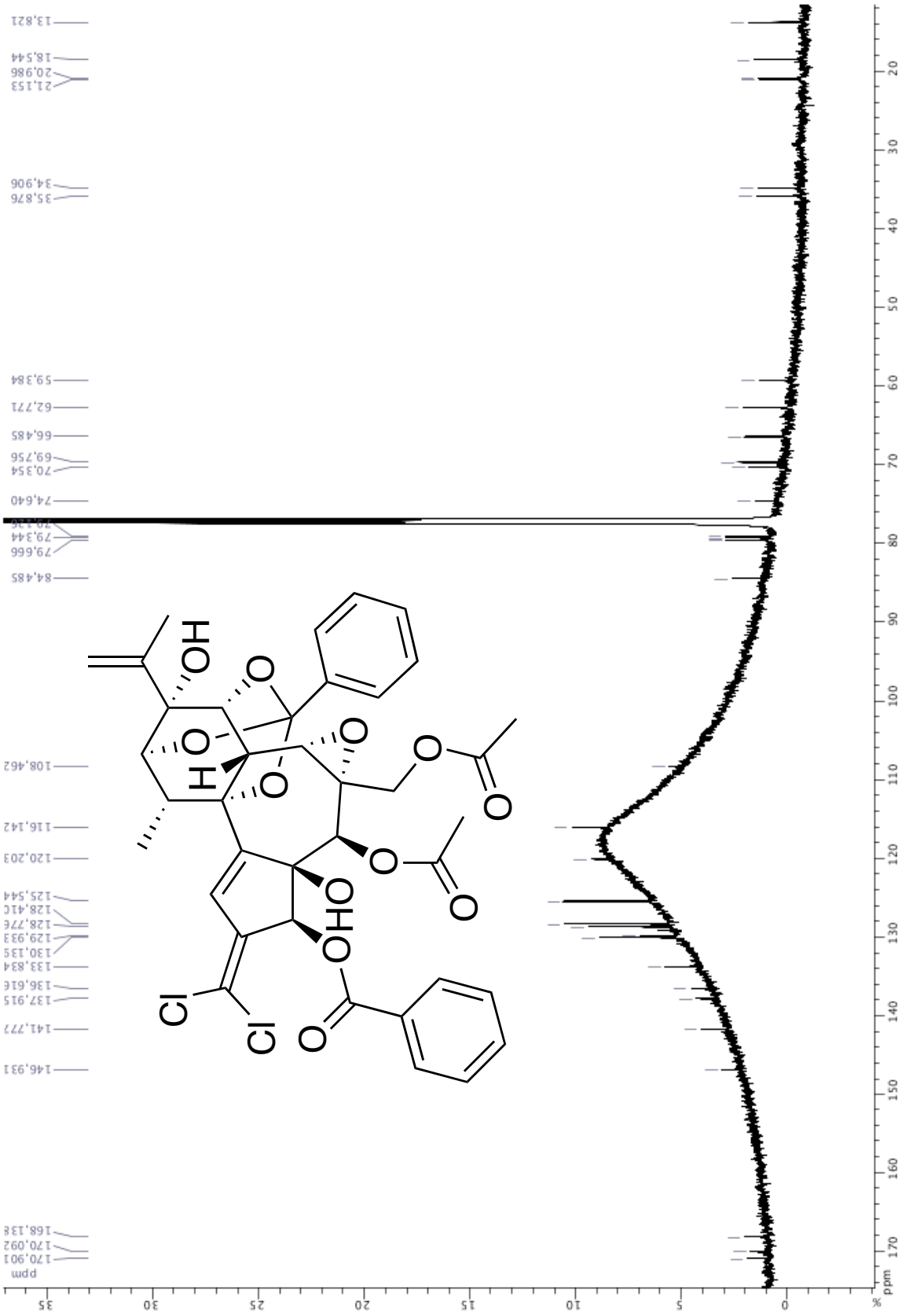


**Figure 209.** Spectre HSQC de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$)

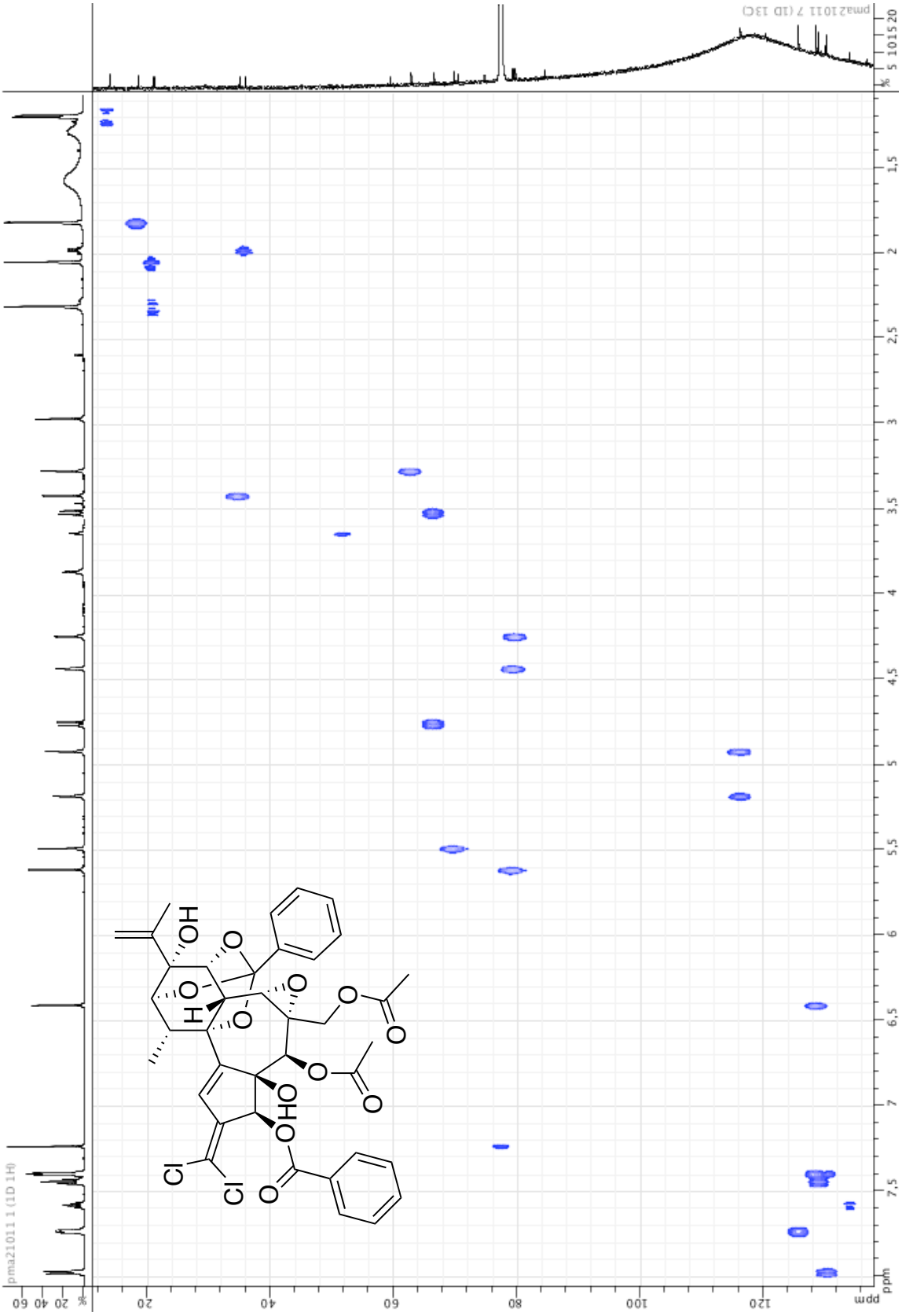


**Figure 210.** Spectre HMBC de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$)

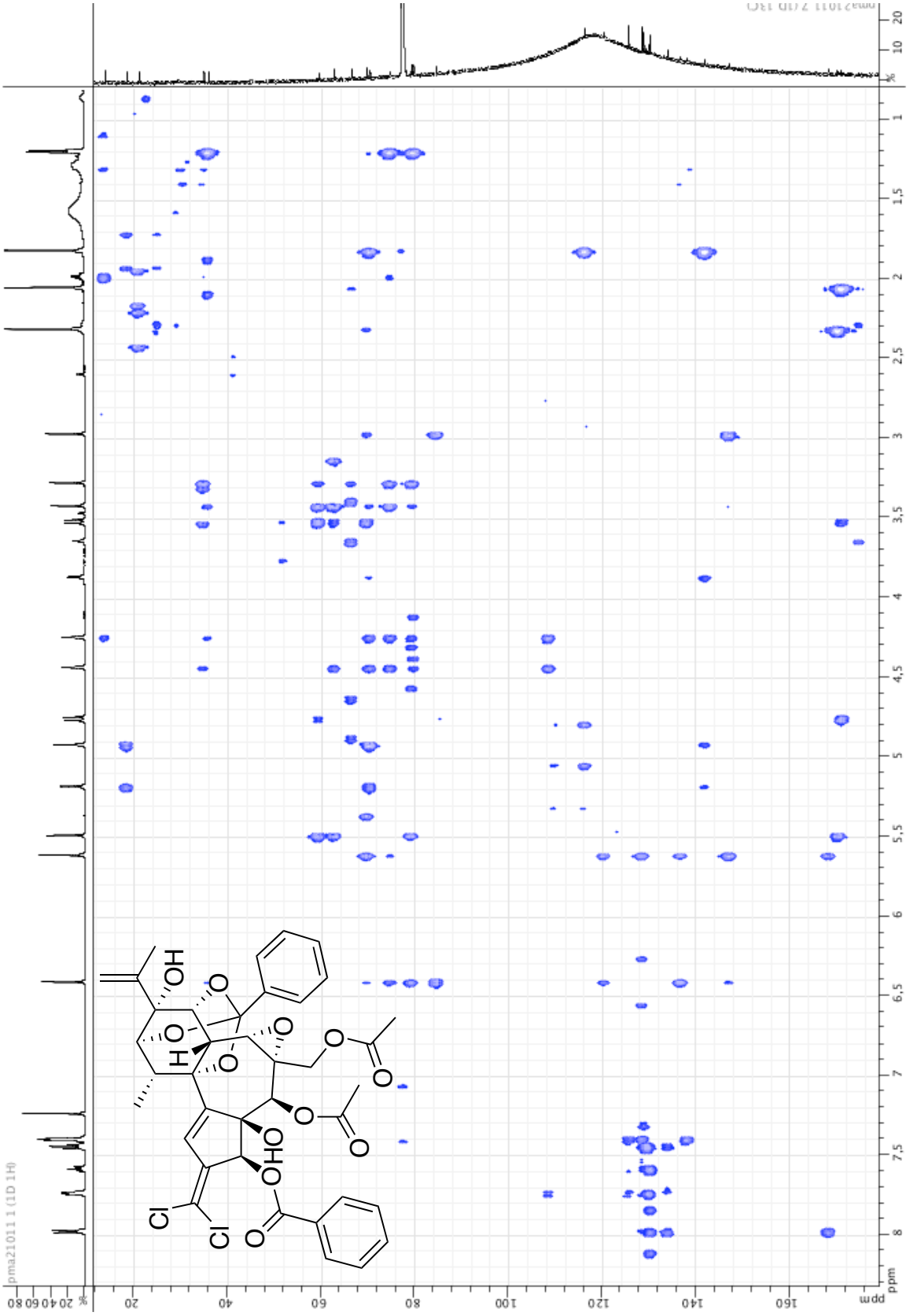


**Figure 211.** Spectre NOESY de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$)

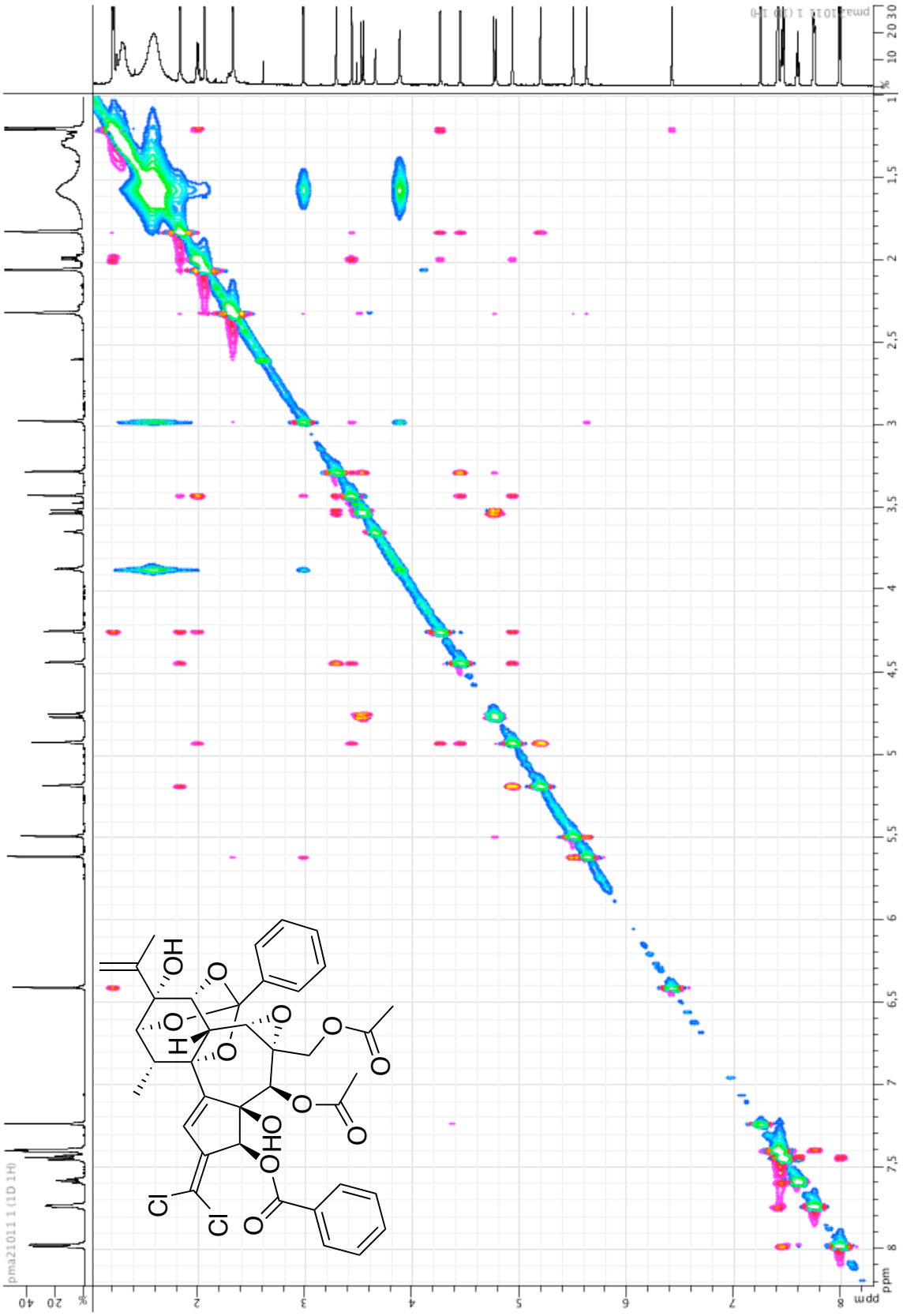
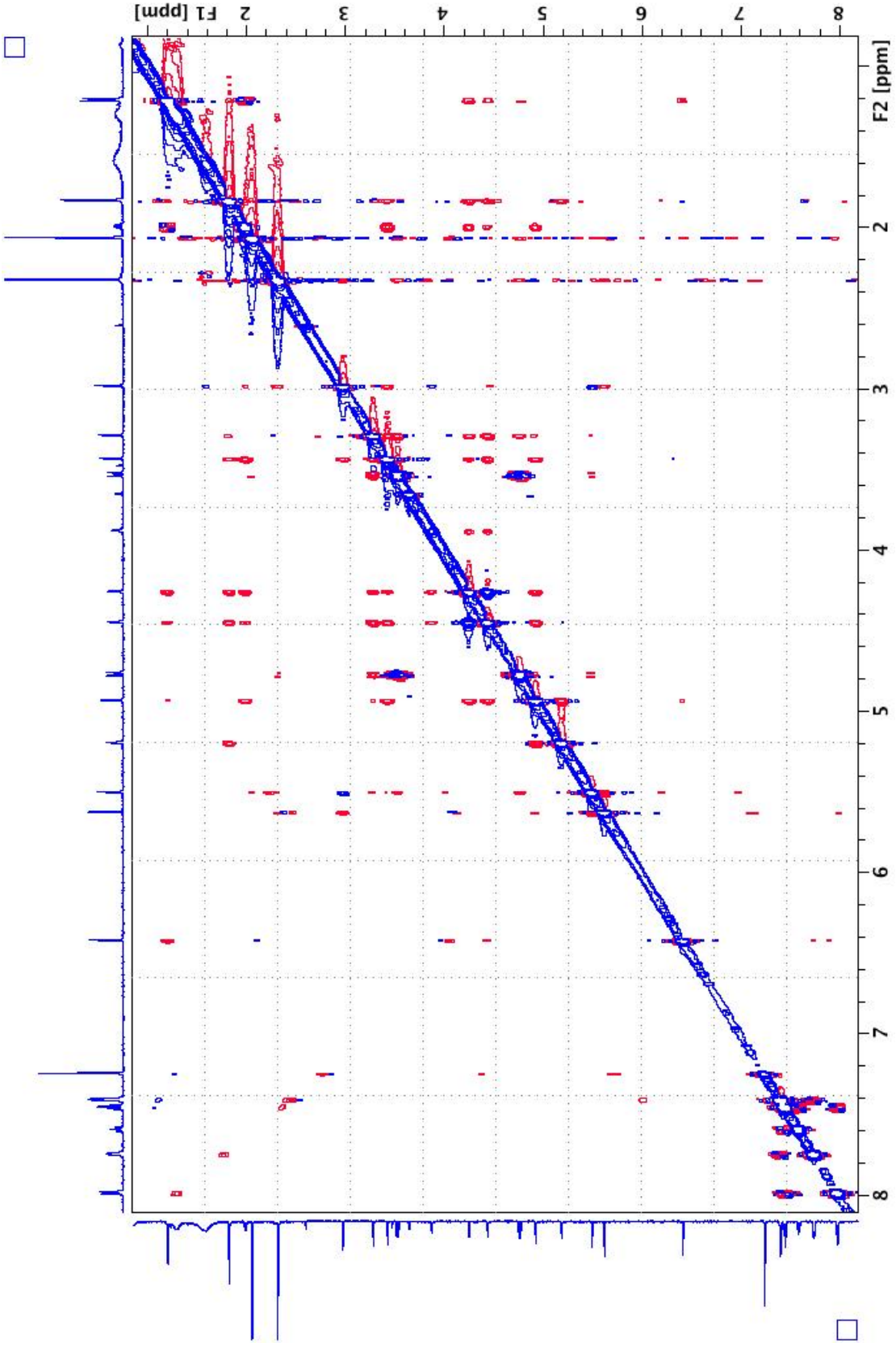


**Figure 212.** Spectre ROESY de la trigocherrine A **112** (600 MHz, $CDCl_3$)



ANNEXE 8

# Spectres RMN 1D ($^{1}$H et $^{13}$C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) du trigocherriolide A( 118)

**Figure 213.** Spectre $^{1}$H du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$)

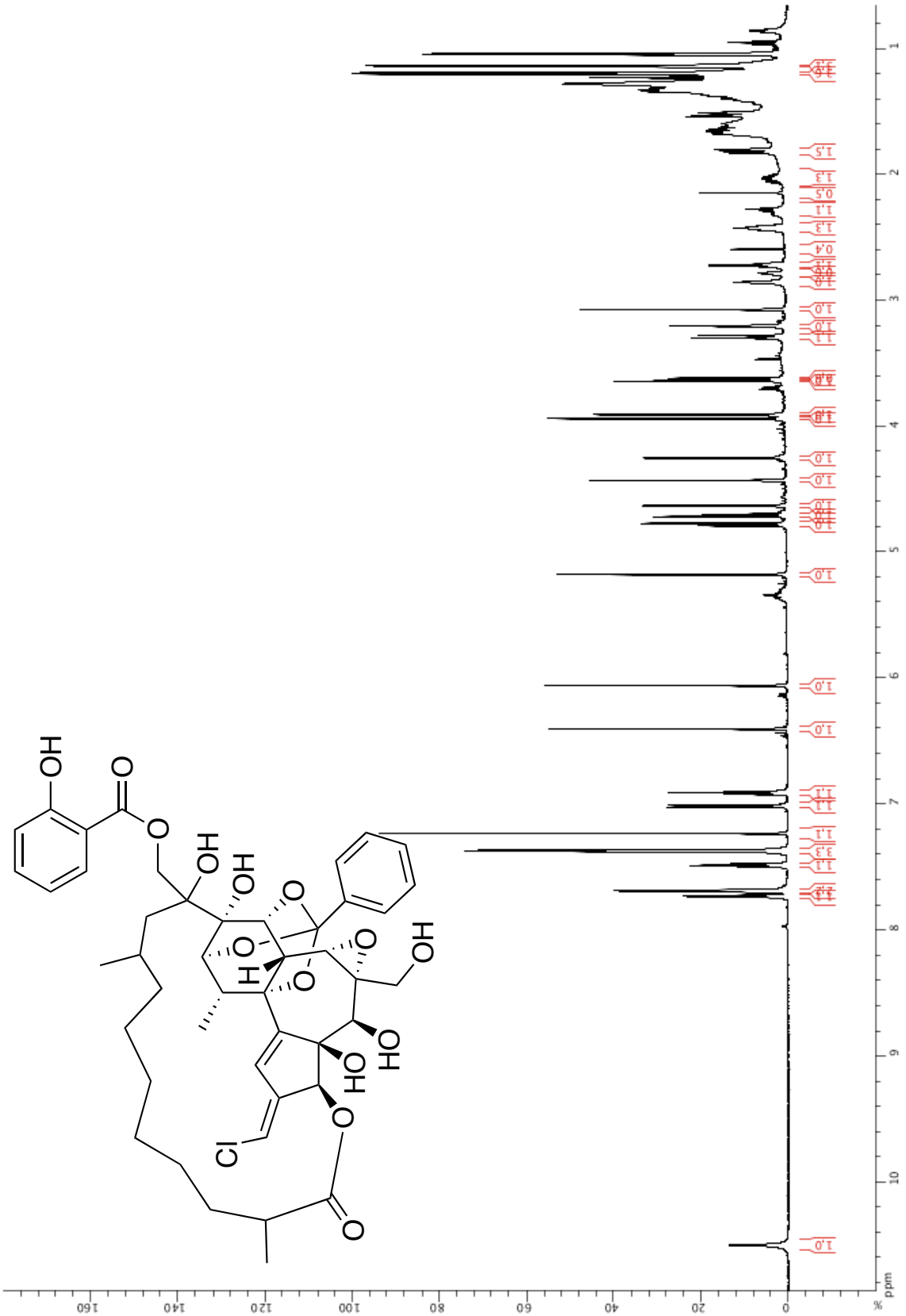


**Figure 214.** Spectre $^{13}C$ du trigocherriolide A **118** (150 MHz, $CDCl_3$)

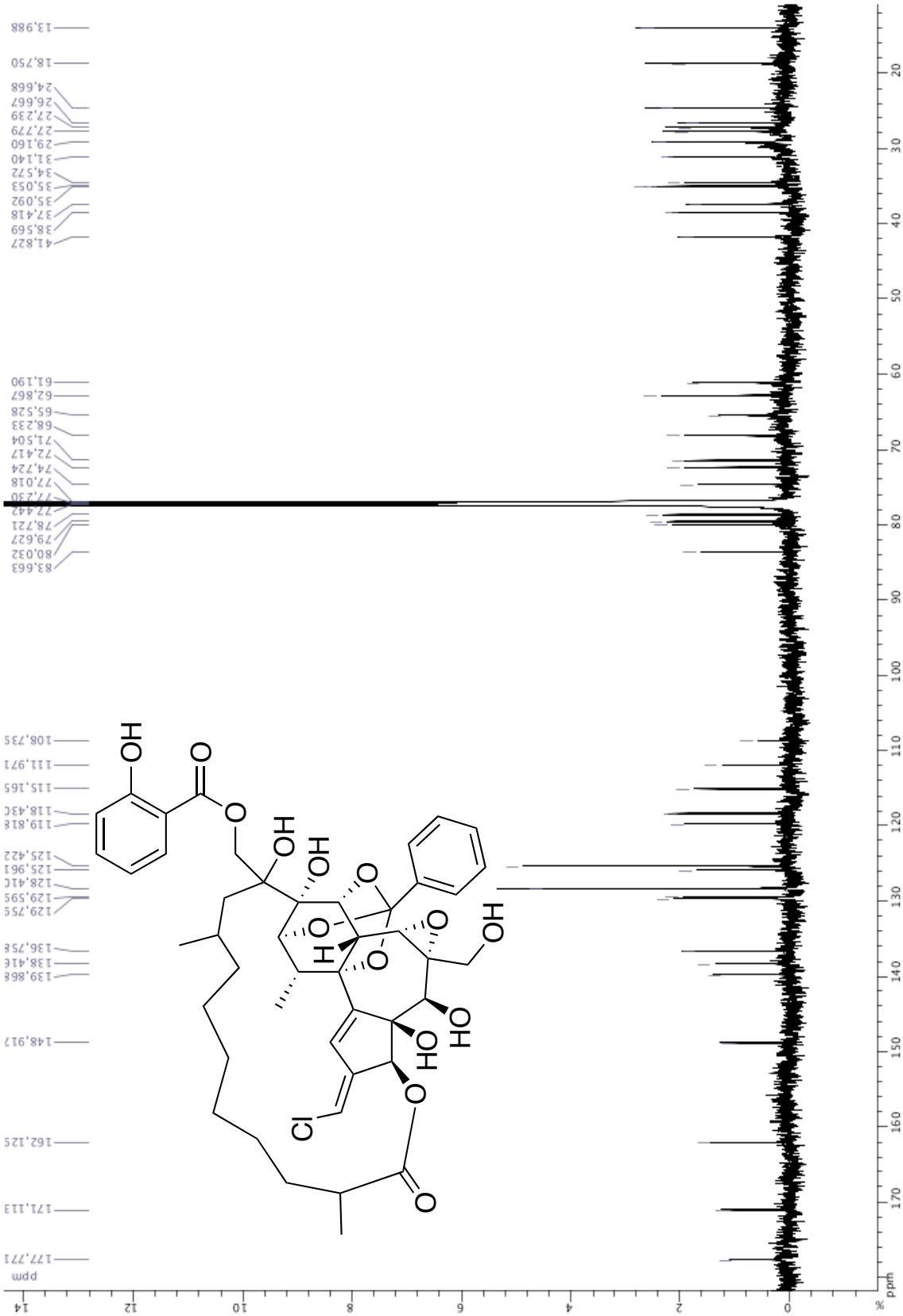


**Figure 215.** Spectre HSQC du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$)

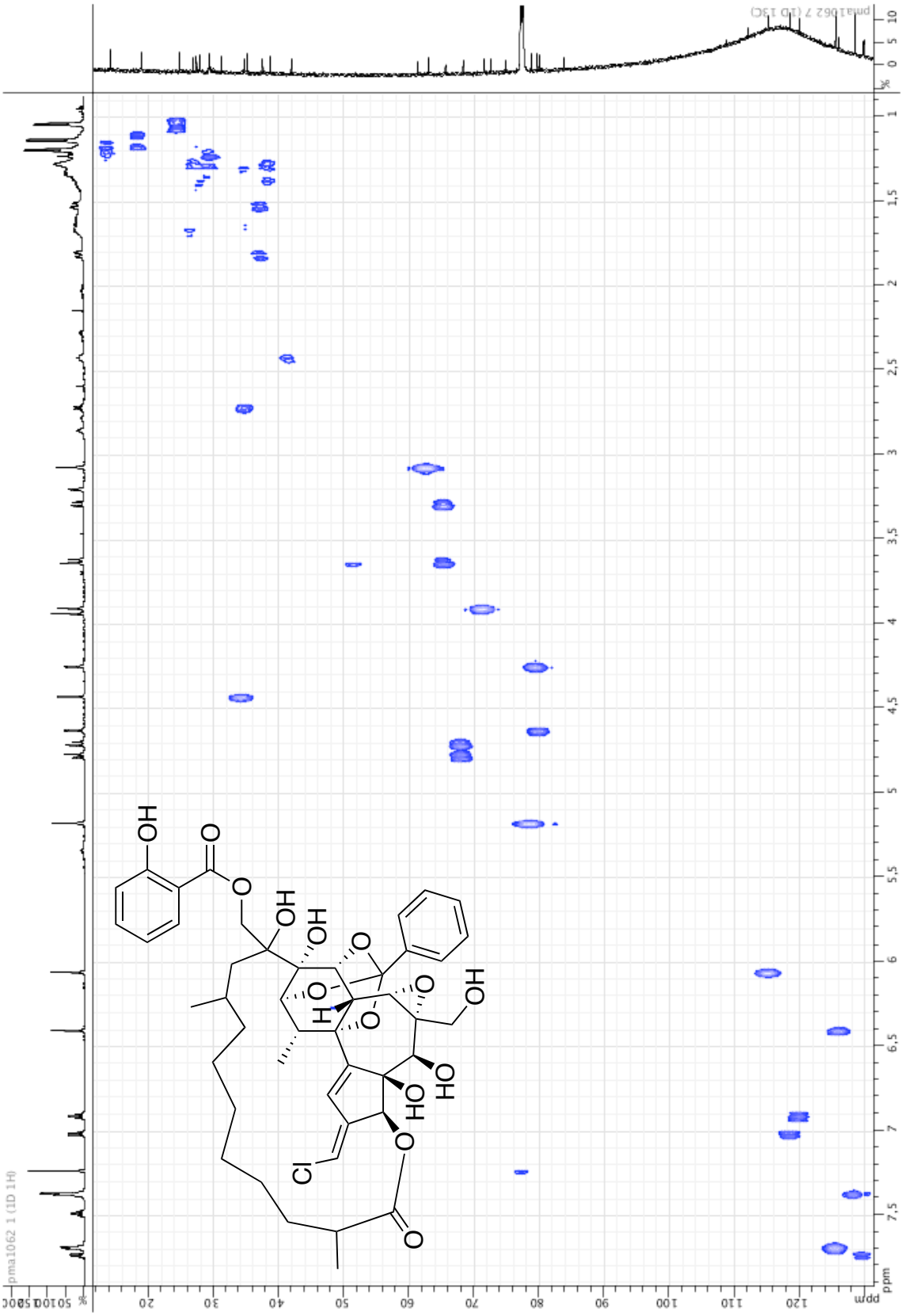


**Figure 216.** Spectre HMBC du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$)

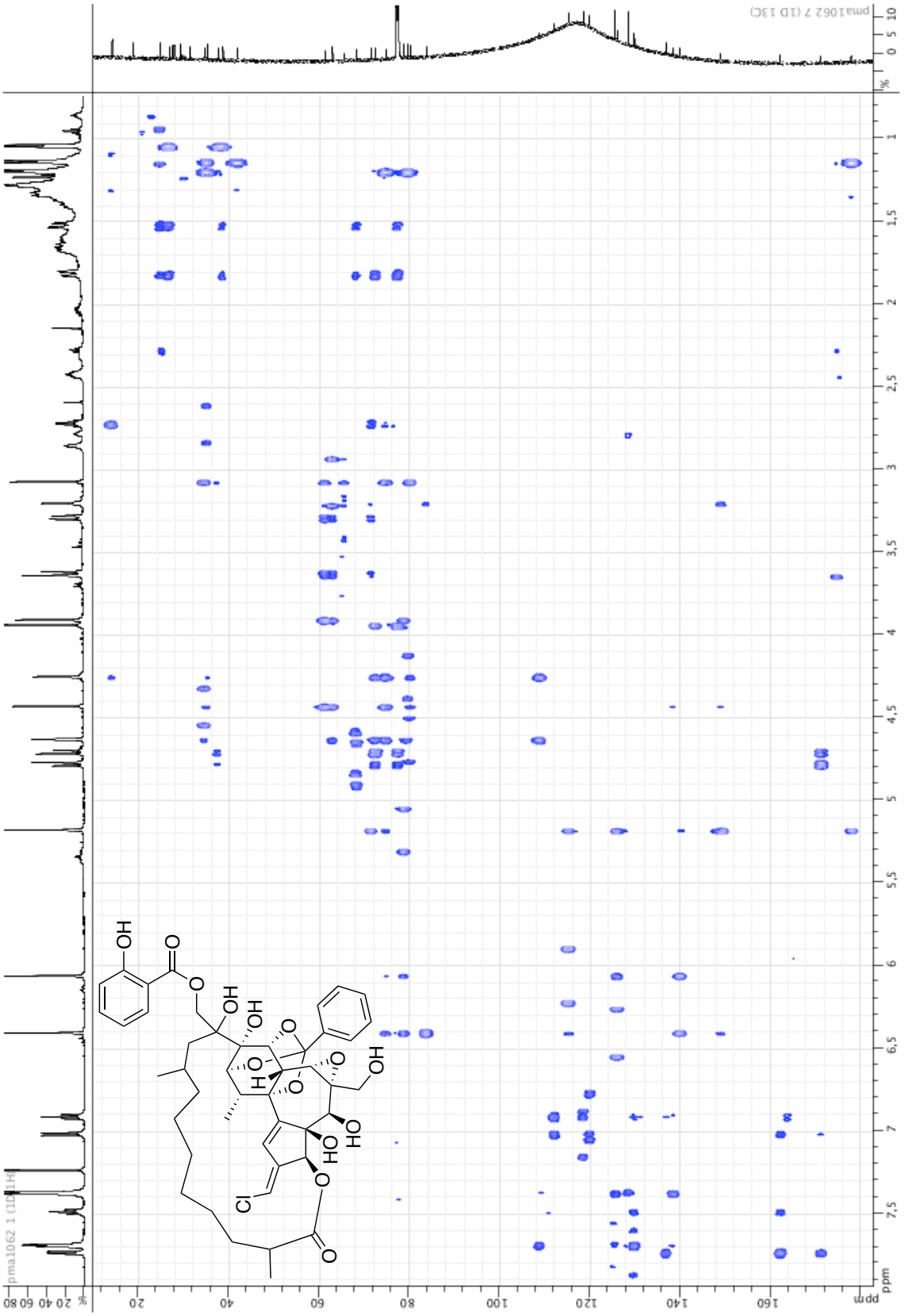
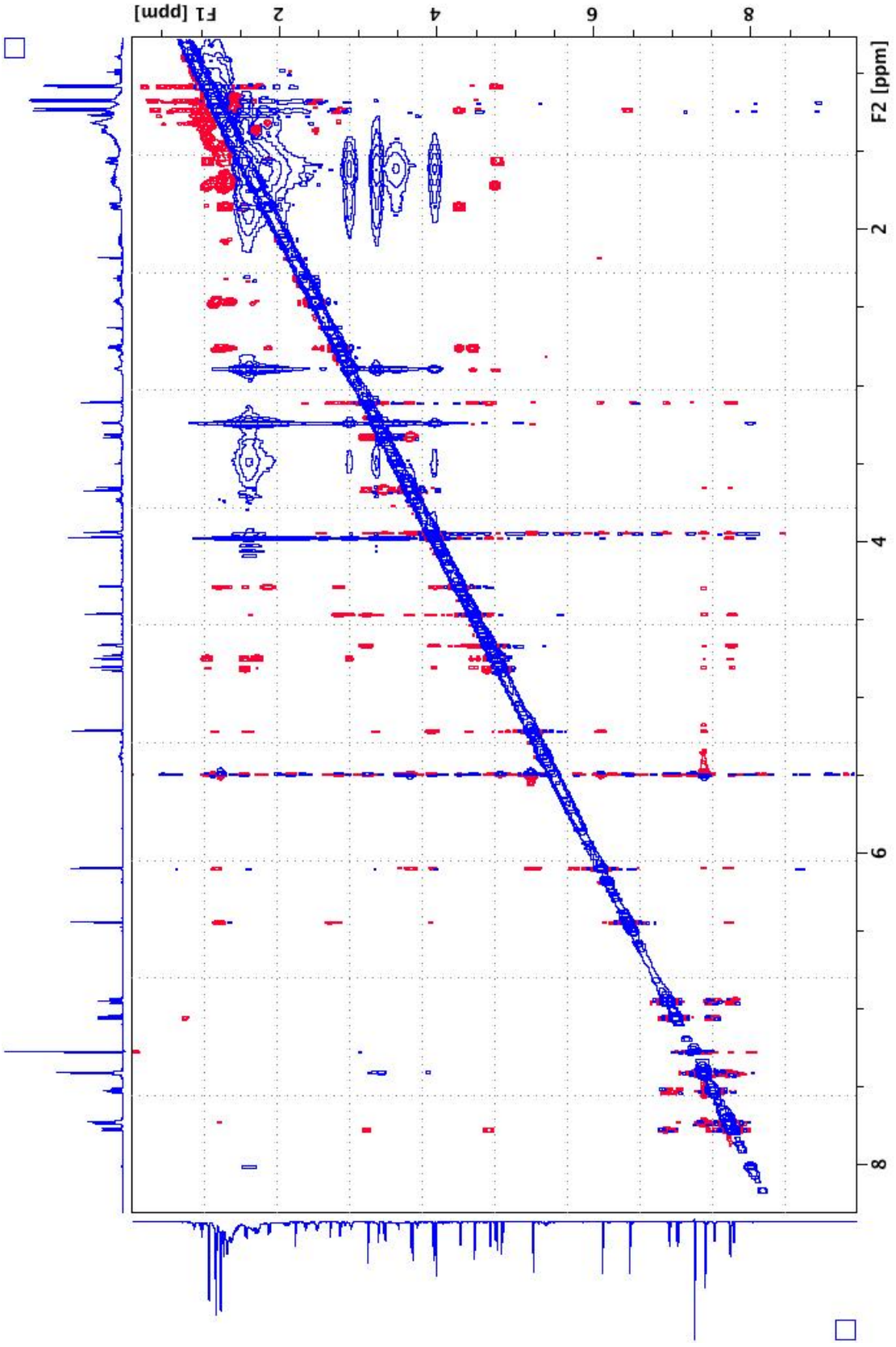


**Figure 217.** Spectre ROESY du trigocherriolide A **118** (600 MHz, $CDCl_3$)



ANNEXE 9

# Spectres RMN $^{1}$H des trigocherrines B-F (113-117) et des trigocherriolides B-D (119-121)

**Figure 218.** Spectre $^{1}$H de la trigocherrine B (**113**) (600 MHz, $CDCl_3$)

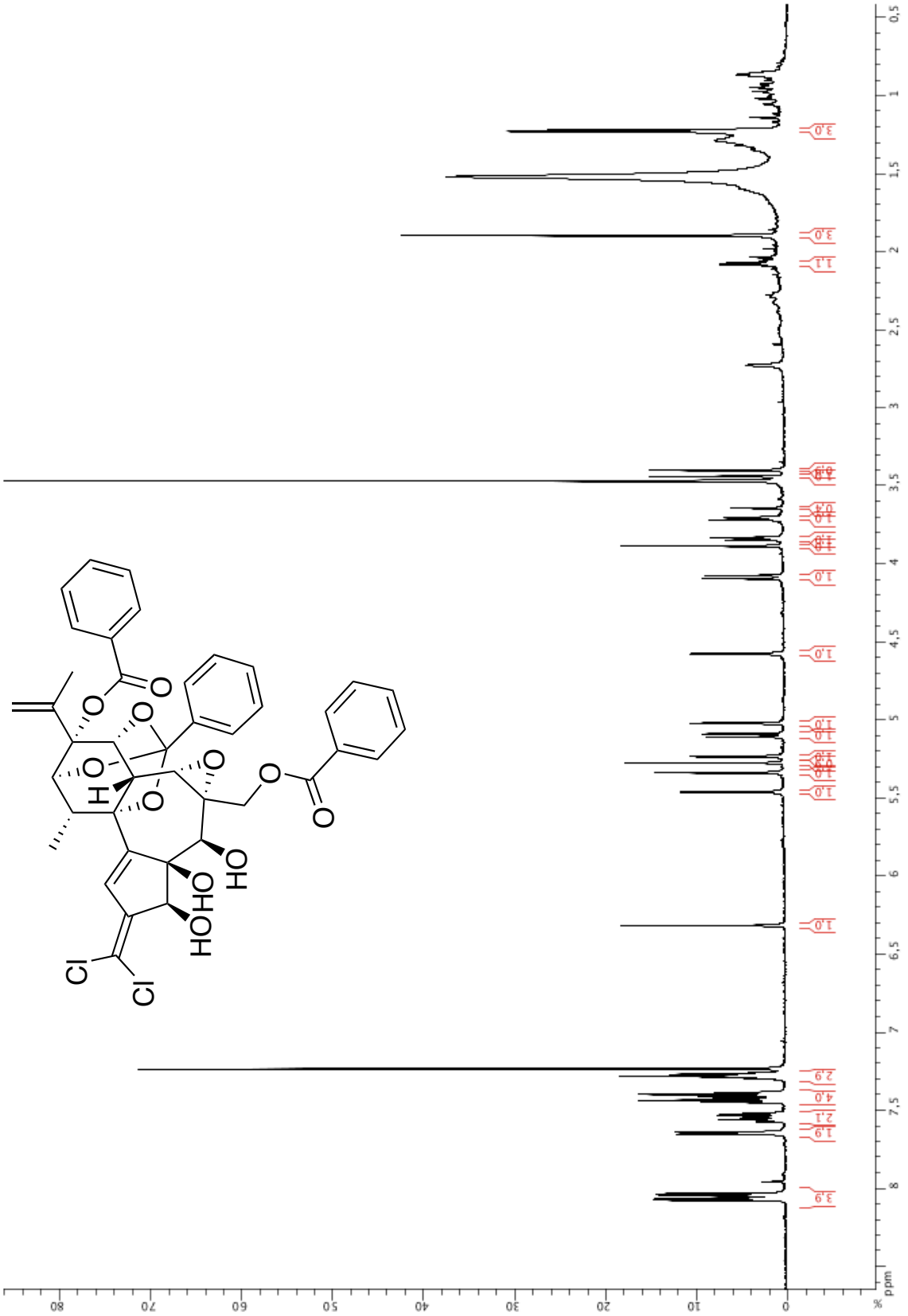


**Figure 219.** Spectre $^{1}$H de la trigocherrine C (**114**) (600 MHz, $CDCl_3$)

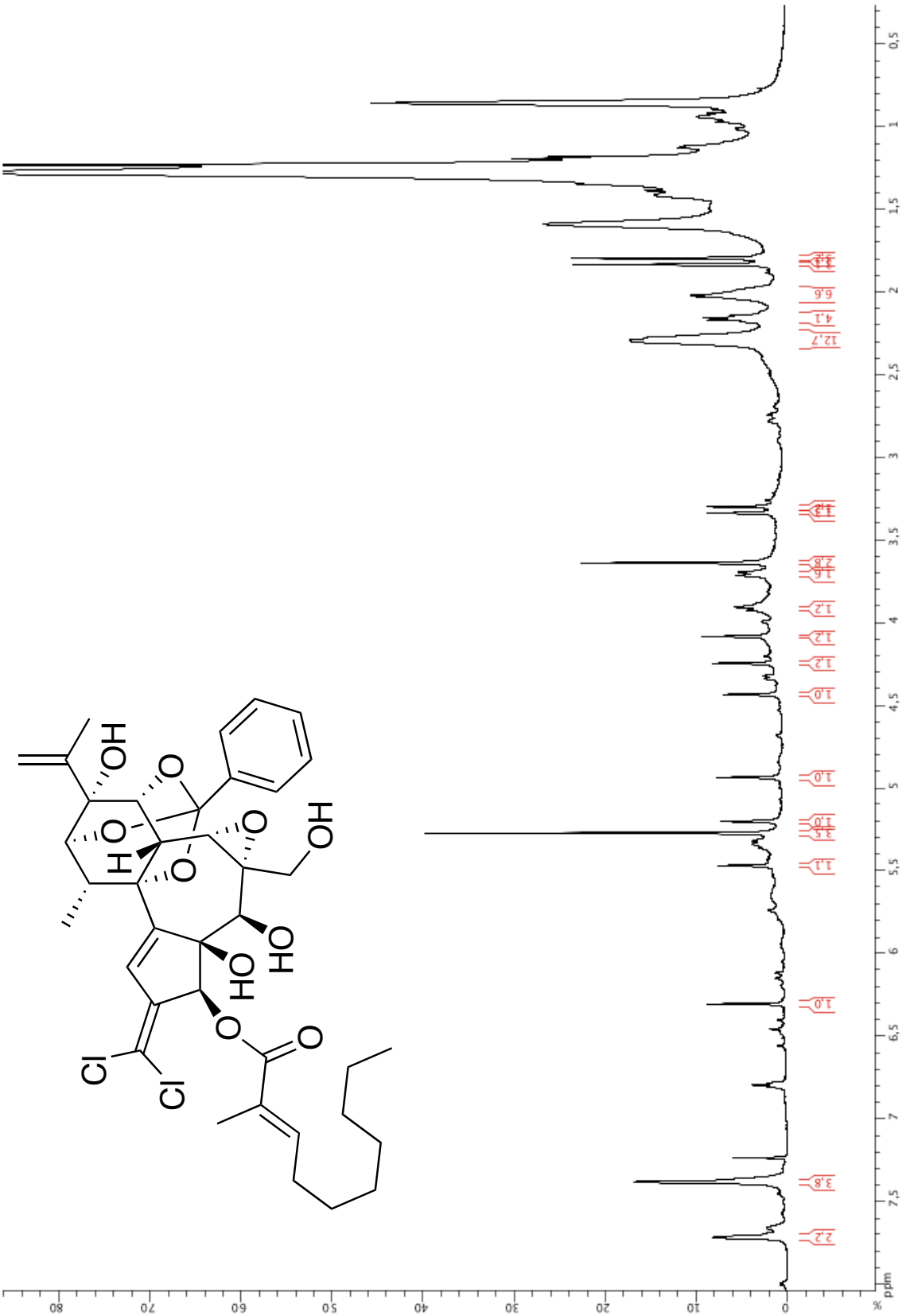


**Figure 220.** Spectre $^{1}H$ de la trigocherrine D (**115**) (600 MHz, $CDCl_3$)

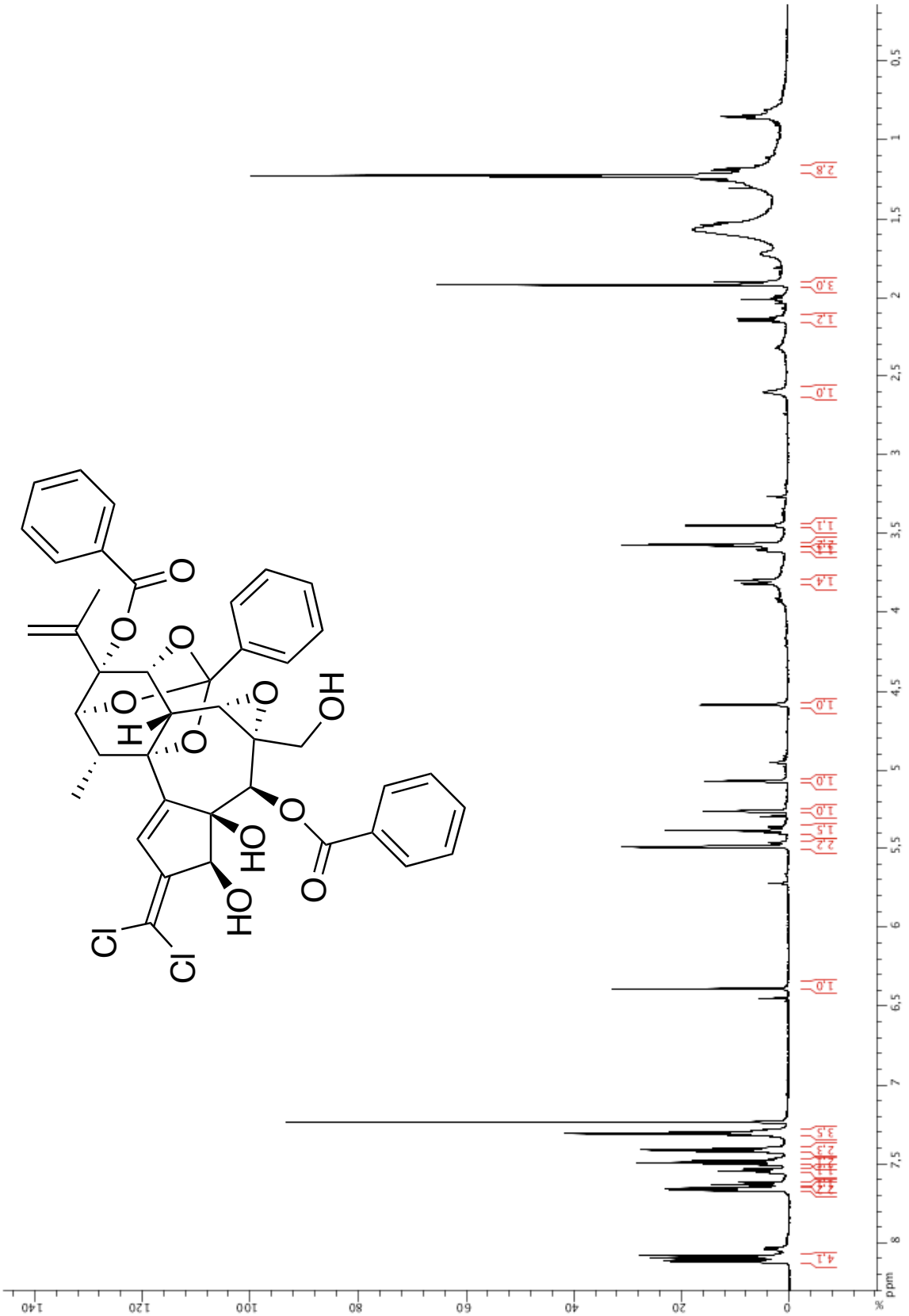


**Figure 221.** Spectre $^{1}$H de la trigocherrine E (**116**) (600 MHz, $CDCl_3$)

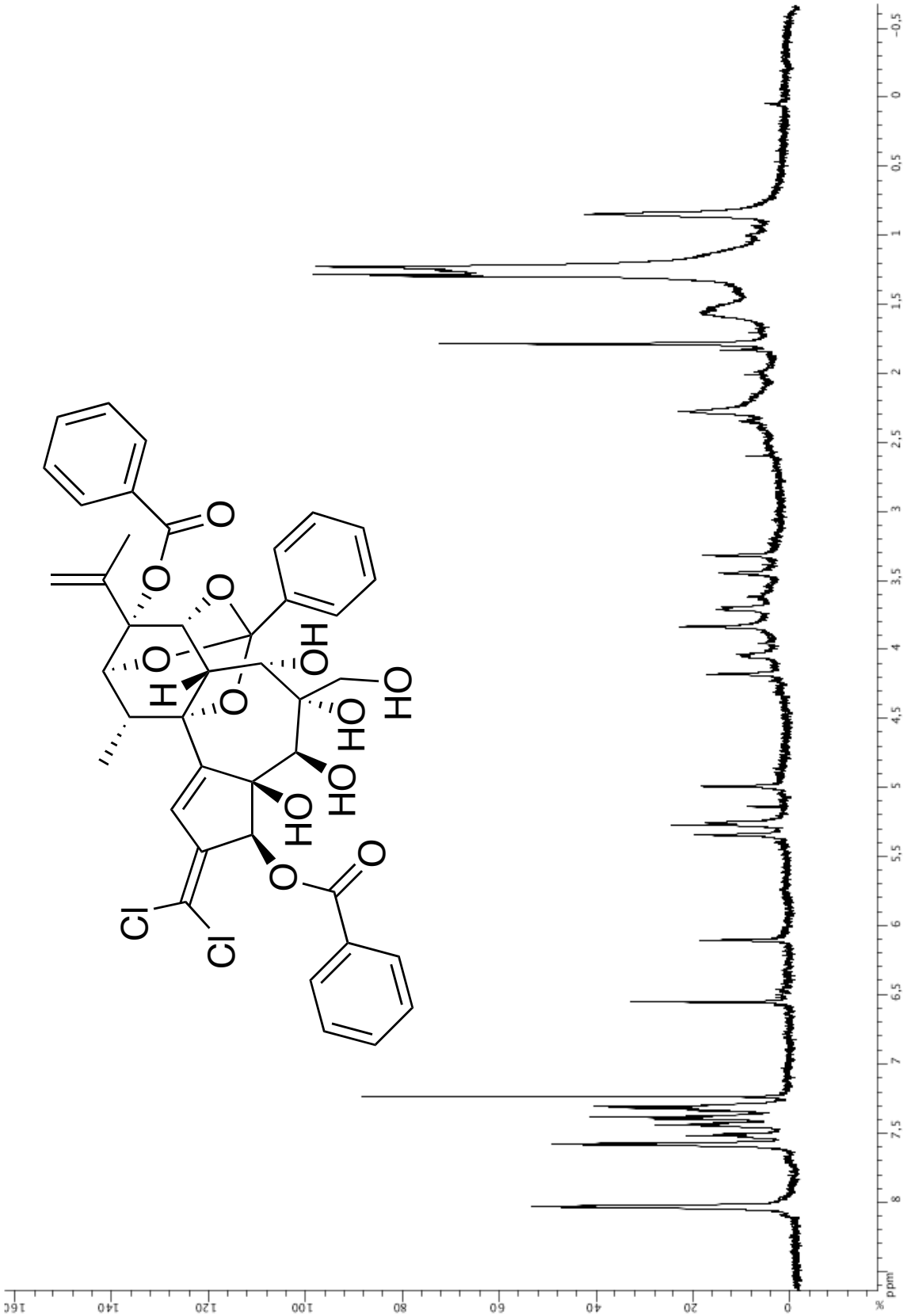


**Figure 222.** Spectre $^{1}$H de la trigocherrine F (**117**) (600 MHz, $CDCl_3$)

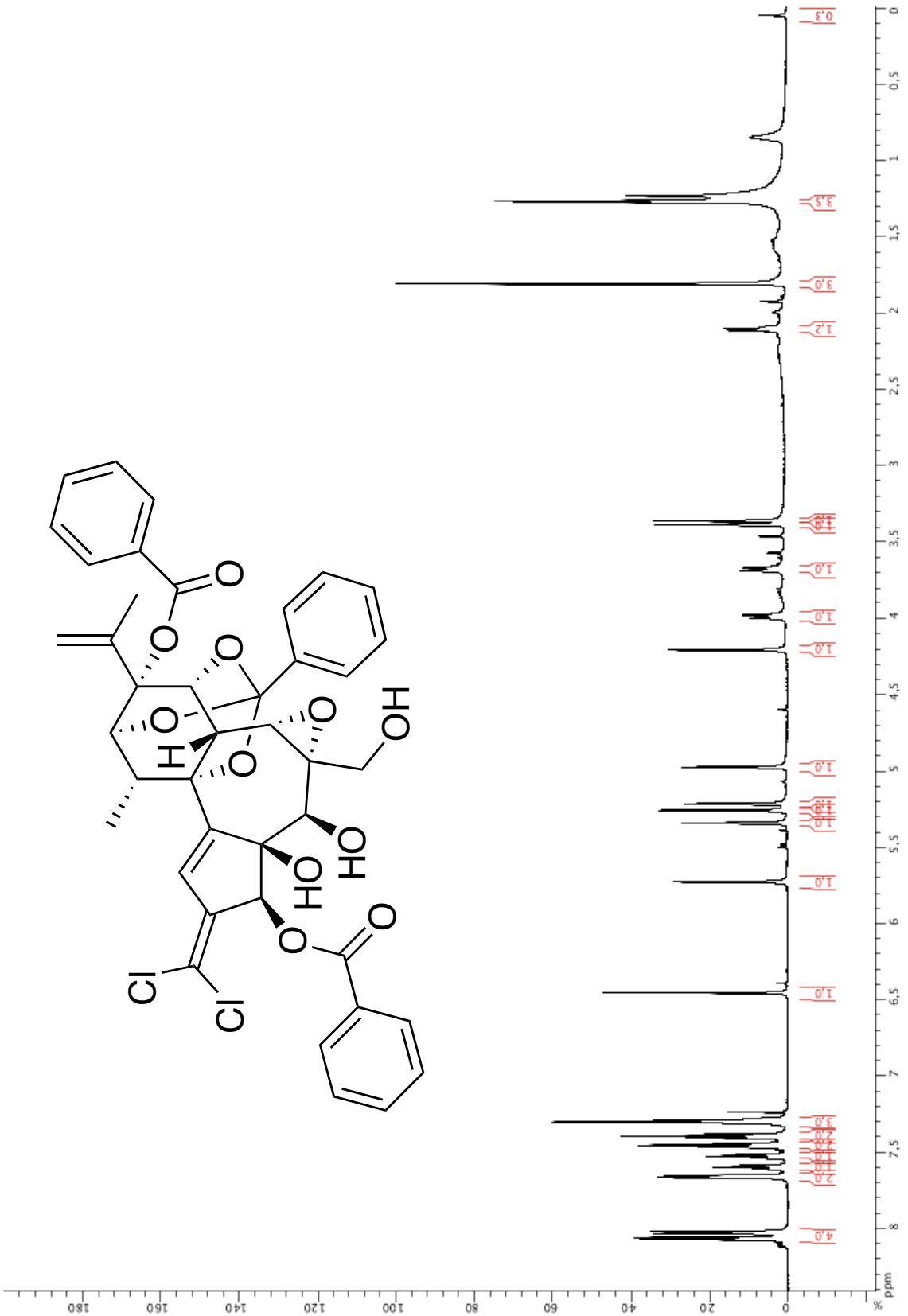


**Figure 223.** Spectre $^{1}$H du trigocherriolide B (**119**) (600 MHz, $CDCl_3$)

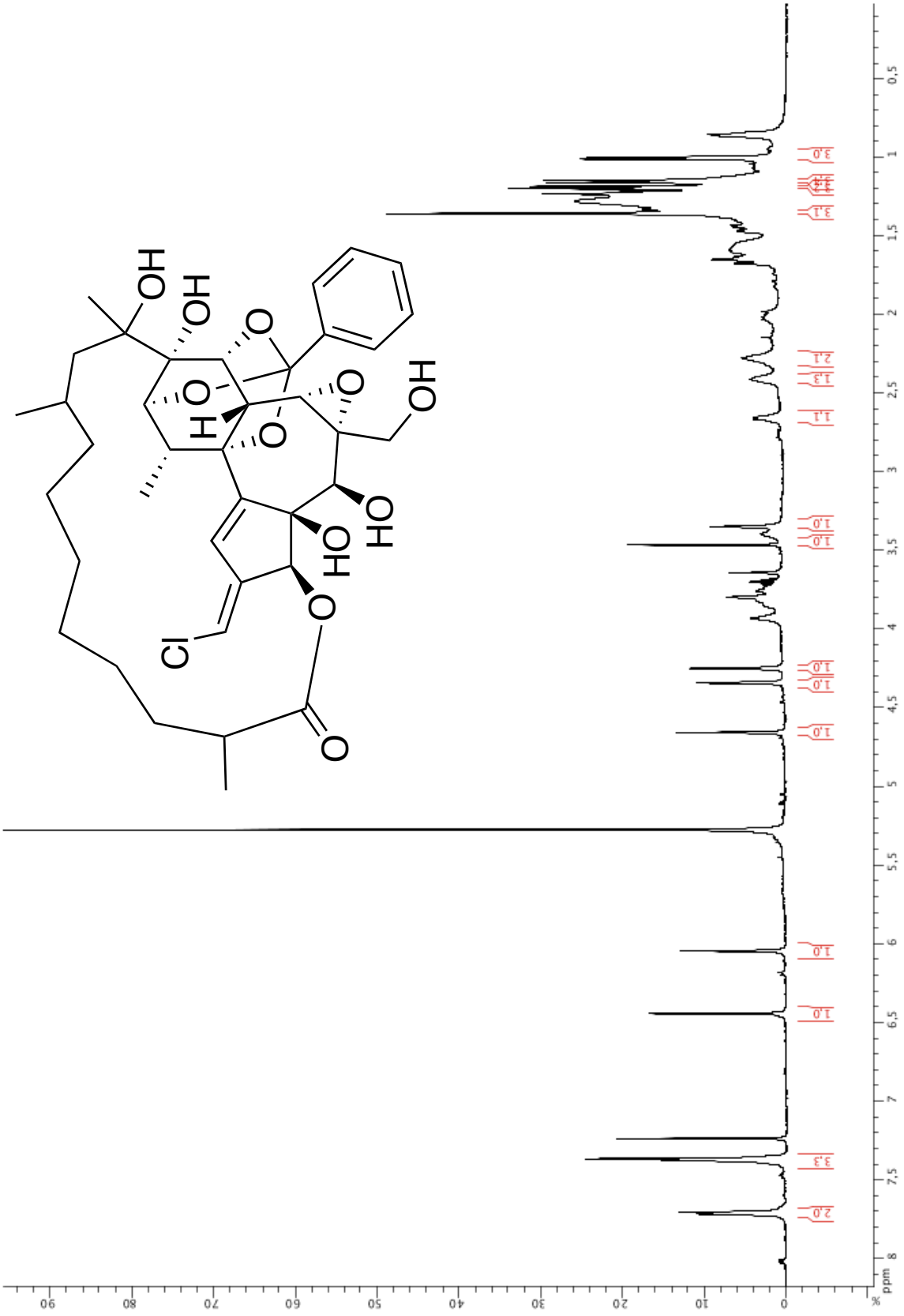


**Figure 224.** Spectre $^{1}H$ du trigocherriolide C (**120**) (600 MHz, $CDCl_3$)

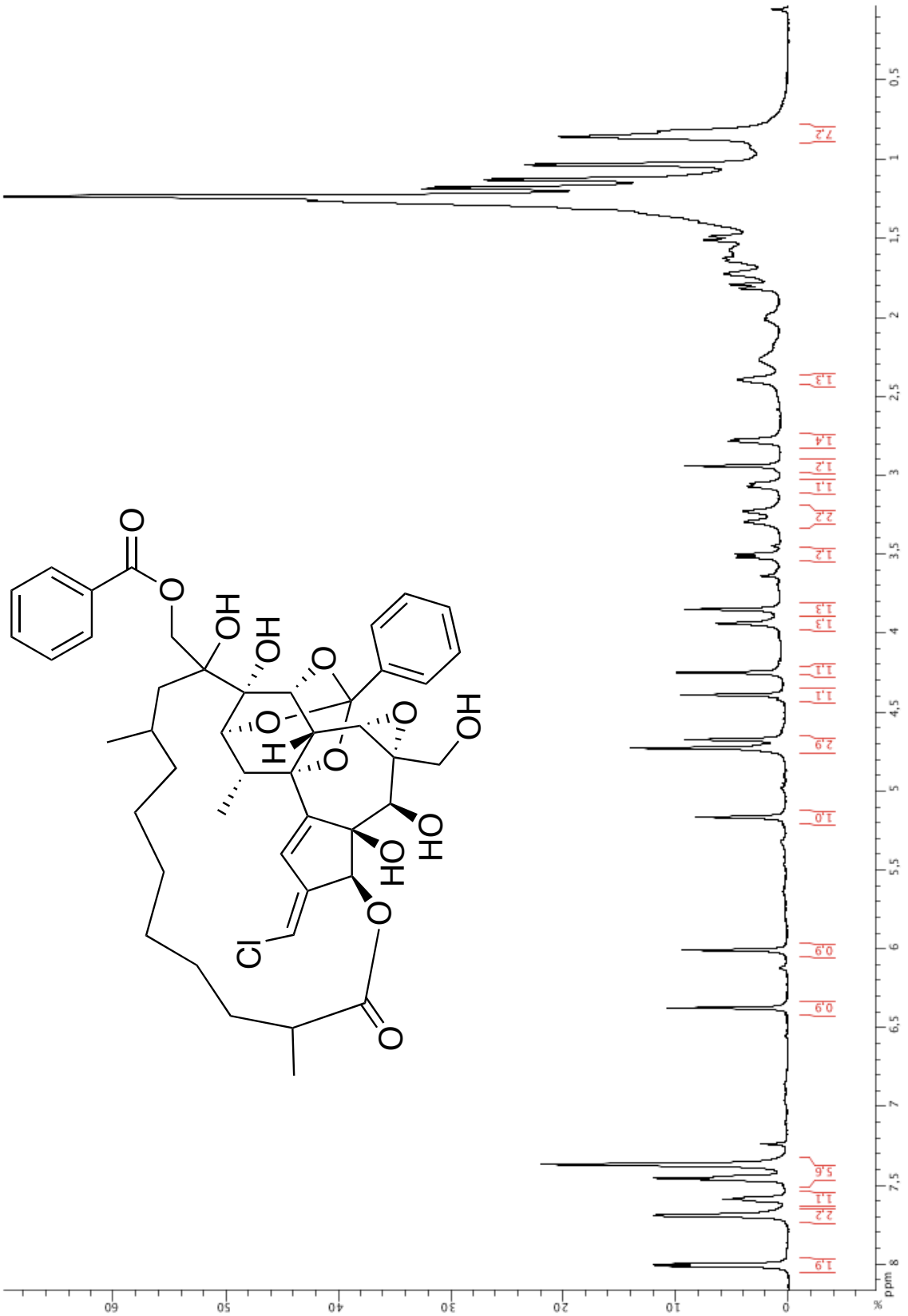


**Figure 225.** Spectre $^{1}$H du trigocherriolide D (**121**) (600 MHz, $CDCl_3$)

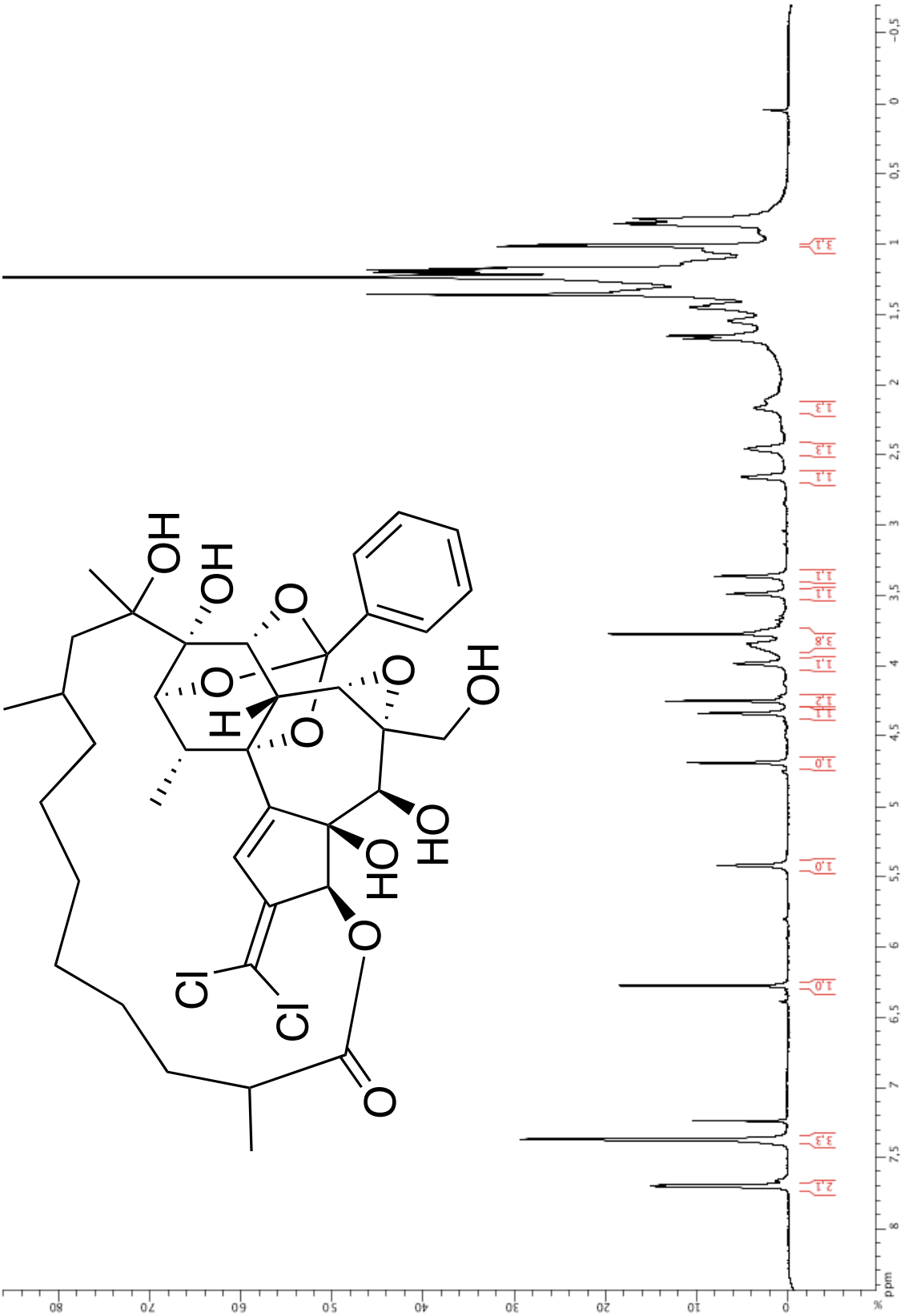


**Tableau 21. Données RMN $^{1}$H et $^{13}$C des trigocherrines de *Trigonostemon cherrieri* (600 MHz, $CDCl_3$)**

| | **Trigocherrine A (112)** | | **Trigocherrine B (113)** | | | **Trigocherrine C (114)** | | | **Trigocherrine D (115)** | | | **Trigocherrine E (116)** | | | **Trigocherrine F (117)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | ***Squelette Daphnane*** | | | | | | | | | |
| no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
| 1 | 128.4 | 6.41, s | 1 | 127.0 | 6.32, s | 1 | 127.5 | 6.31, s | 1 | 127.3 | 6.39, s | 1 | 128.4 | 6.56, s | 1 | 127.4 | 6.46, s |
| 2 | 136.6 | - | 2 | 140.6 | - | 2 | 137.3 | - | 2 | 140 | - | 2 | 136.7 | - | 2 | 137.2 | - |
| 3 | 79.1 | 5.62, s | 3 | 76.7 | 4.58, s | 3 | 79.3 | 5.47, s | 3 | 76.5 | 4.59, s | 3 | 78.3 | 6.11, s | 3 | 79.7 | 5.73, s |
| 4 | 84.5 | - | 4 | 82.8 | - | 4 | 83.4 | - | 4 | 83.5 | - | 4 | 87.4 | - | 4 | 83.6 | - |
| 5 | 69.8 | 5.50, s | 5 | 70.6 | 3.85, d (8.0) | 5 | 72.8 | 4.08, br s | 5 | 72.2 | 5,49, s | 5 | 74.2 | 3.84, s | 5 | 72.7 | 4.21, s |
| 6 | 59.4 | - | 6 | 60.5 | - | 6 | 61.4 | - | 6 | 60.9 | - | 6 | 76 | - | 6 | 61.5 | - |
| 7 | 62.8 | 3.28, s | 7 | 63.0 | 3.40, s | 7 | 62.6 | 3.34, s | 7 | 61.9 | 3.58, s | 7 | 80.4 | 4.18, s | 7 | 62.7 | 3.37, s |
| 8 | 34.9 | 3.43, s | 8 | 34.7 | 3.44, s | 8 | 35.0 | 3.30, s | 8 | 34.7 | 3.57, s | 8 | 35.4 | 3.32, s | 8 | 34.7 | 3.39, s |
| 9 | 74.6 | - | 9 | 74.8 | - | 9 | 74.9 | - | 9 | 74.7 | - | 9 | 74 | - | 9 | 75.1 | - |
| 10 | 146.9 | - | 10 | 149.0 | - | 10 | 148.9 | - | 10 | 148.6 | - | 10 | 149.9 | - | 10 | 149.2 | - |
| 11 | 35.9 | 1.99, q, (7.0) | 11 | 36.0 | 2.08, q, (7.0) | 11 | 36.0 | 2.02, q (7.0) | 11 | 36.0 | 2.14, q (7.0) | 11 | 36.0 | 2.28, m | 11 | 35.7 | 2.11, q (7.0) |
| 12 | 79.7 | 4.25, br s | 12 | 76.37 | 5.02, br s | 12 | 79.8 | 4.25, br s | 12 | 76.3 | 5.08, br s | 12 | 76.8 | 5.00, br s | 12 | 76.5 | 4.98, br s |
| 13 | 70.4 | - | 13 | 79.0 | - | 13 | 70.4 | - | 13 | 79.1 | - | 13 | 78.9 | - | 13 | 79.1 | - |
| 14 | 79.3 | 4.44, br s | 14 | 76.4 | 5.23, br s | 14 | 79.4 | 4.44, br s | 14 | 76.5 | 5.26, br s | 14 | 78 | 5.25, br s | 14 | 76.3 | 5.22, br s |
| 15 | 141.8 | - | 15 | 138.6 | - | 15 | 141.9 | - | 15 | 138.3 | - | 15 | 137.6 | - | 15 | 138.3 | - |
| 16 | 116.1 | 5.19, s | 16 | 119.9 | 5.46, s | 16 | 116.0 | 5.20, s | 16 | 120.0 | 5.39, s | 16 | 120.1 | 5.28, s | 16 | 120.0 | 5.26, s |
| | | 4.93, s | | | 5.34, s | | | 4.94, s | | | 5.49, s | | | 5.34, s | | | 5.35, s |
| 17 | 18.5 | 1.82, s | 17 | 18.8 | 1.90, s | 17 | 18.5 | 1.84, s | 17 | 18.9 | 1.92, s | 17 | 18.8 | 1.79, s | 17 | 18.8 | 1.81, s |
| 18 | 13.8 | 1.20, d, (7.0) | 18 | 13.8 | 1.23, d, (7.0) | 18 | 13.8 | 1.19, d, (7.0) | 18 | 13.5 | 1.24, d (7.0) | 18 | 13.9 | 1.29, d (7.0) | 18 | 13.9 | 1.27, d (7.0) |
| 19 | 120.2 | - | 19 | 118.3 | - | 19 | 118.7 | - | 19 | 119.5 | - | 19 | 119.8 | - | 19 | 119.0 | - |
| 20 | 66.5 | 4.76, d, (12.2) | 20 | 67.3 | 5.07, d, (12.1) | 20 | 65.5 | 3.75, d (12.2) | 20 | 62.9 | 3.60, d (12.2) | 20 | 69.6 | 3.70, d (10.9) | 20 | 65.8 | 3.68, d (12.0) |
| | | 3.52, d, (12.2) | | | 4.12, d, (12.1) | | | 3.93, d (12.2) | | | 3.81, d (12.2) | | | 4.05, d (10.9) | | | 3.99, d (12.0) |
| 1′ | 108.5 | - | 1′ | 108.5 | - | 1′ | 108.5 | - | 1′ | 108.3 | - | 1′ | 108.1 | - | 1′ | 108.3 | - |
| 2′ | 137.9 | - | 2′ | 138.1 | - | 2′ | 138.1 | - | 2′ | 137.9 | - | 2′ | 137.5 | - | 2′ | 138.3 | - |
| 3′ | 125.5 | 7.74, m | 3′ | 125.6 | 7.65, m | 3′ | 125.5 | 7.72, m | 3′ | 125.5 | 7.67, m | 3′ | 125 | 7.59, m | 3′ | 125.5 | 7.66, m |
| 4′ | 128.4 | 7.40, m | 4′ | 128.2 | 7.28, m | 4′ | 128.4 | 7.39, m | 4′ | 128.3 | 7.31, m | 4′ | 128.3 | 7.31, m | 4′ | 128.3 | 7.30, m |
| 5′ | 129.9 | 7.40, m | 5′ | 129.6 | 7.28, m | 5′ | 129.8 | 7.39, m | 5′ | 129.7 | 7.31, m | 5′ | 129.7 | 7.31, m | 5′ | 129.6 | 7.30, m |
| 6′ | 128.4 | 7.40, m | 6′ | 128.2 | 7.28, m | 6′ | 128.4 | 7.39, m | 6′ | 128.3 | 7.31, m | 6′ | 128.3 | 7.31, m | 6′ | 128.3 | 7.30, m |
| 7′ | 125.5 | 7.74, m | 7′ | 125.6 | 7.65, m | 7′ | 125.5 | 7.72, m | 7′ | 125.5 | 7.67, m | 7′ | 125 | 7.59, m | 7′ | 125.5 | 7.66, m |
| | | | | | | | | ***Substituants*** | | | | | | | | | |
| 1″ | 168.1 | - | 1″ | 167.2 | - | 1″ | 169.5 | - | 1″ | 166.1 | - | 1″ | 167.4 | - | 1″ | 167.9 | - |
| 2″ | 129.3 | - | 2″ | 129.57 | - | 2″ | 126.6 | - | 2″ | 133.7 | - | 2″ | 128.9 | - | 2″ | 129.3 | - |
| 3″ | 130.1 | 7.98, d, (7.6) | 3″ | 129.0 | 8.04, d, (7.8) | 3″ | 145.5 | 6.80, t (7.0) | 3″ | 130.3 | 8.12, d (7.8) | 3″ | 130 | 8.03, m | 3″ | 130.2 | 8.03, d (7.8) |
| 4″ | 128.8 | 7.45, t, (7.6) | 4″ | 128.8 | 7.44, t, (7.8) | 4″ | 29.1 | 2.18, q (7.0) | 4″ | 129.0 | 7.50, t (7.8) | 4″ | 128.6 | 7.44, m | 4″ | 128.8 | 7.46, t (7.8) |
| 5″ | 133.8 | 7.59, t, (7.6) | 5″ | 133.6 | 7.56, t, (7.8) | 5″ | 28.7 | 1.43, t (7.0) | 5″ | 134.3 | 7.64, t (7.8) | 5″ | 133.7 | 7.58, t (7.6) | 5″ | 134.0 | 7.60, t (7.8) |
| 6″ | 128.8 | 7.45, t, (7.6) | 6″ | 128.8 | 7.44, t, (7.8) | 6″ | 29.7 | 1.23, m | 6″ | 129.0 | 7.50, t (7.8) | 6″ | 128.6 | 7.44, m | 6″ | 128.8 | 7.46, t (7.8) |
| 7″ | 130.1 | 7.98, d, (7.6) | 7″ | 129.0 | 8.04, d, (7.8) | 7″ | 29.3 | 1.29, m | 7″ | 130.3 | 8.12, d (7.8) | 7″ | 130 | 8.03, m | 7″ | 130.2 | 8.03, d (7.8) |
| 4-OH | - | 2,97, s | 1‴ | 165.5 | - | 8” | 32.1 | 1.24, m | 1‴ | 165.5 | - | 1‴ | 165.1 | - | 1‴ | 165.4 | - |
| 13-OH | - | 3,88, br s | 2‴ | 131.1 | - | 9” | 22.8 | 1.28, m | 2‴ | 132.8 | - | 2‴ | 130.7 | - | 2‴ | 131.2 | - |
| 5-OAc | 170.1, 21.2 | 2.32, s | 3‴ | 130.0 | 8.07, d, (7.8) | 10” | 14.3 | 0.87, t (7.0) | 3‴ | 130.0 | 8.09, d (7.8) | 3‴ | 129.9 | 8.04, m | 3‴ | 130.0 | 8.07, d (7.8) |
| 20-OAc | 170.9, 21.0 | 2.06, s | 4‴ | 128.6 | 7.40, t, (7.8) | 11” | 12.6 | 1.81, s | 4‴ | 128.6 | 7.42, t (7.8) | 4‴ | 128.4 | 7.39, t (7.6) | 4‴ | 128.6 | 7.40, t (7.8) |
| | | | 5‴ | 133.2 | 7.53, t, (7.8) | | | | 5‴ | 133.2 | 7.55, t (7.8) | 5‴ | 132.9 | 7.52, t (7.6) | 5‴ | 133.2 | 7.53, t (7.8) |
| | | | 6‴ | 128.6 | 7.40, t, (7.8) | | | | 6‴ | 128.6 | 7.42, t (7.8) | 6‴ | 128.4 | 7.39, t (7.6) | 6‴ | 128.6 | 7.40, t (7.8) |
| | | | 7‴ | 130.0 | 8.07, d, (7.8) | | | | 7‴ | 130.0 | 8.09, d (7.8) | 7‴ | 129.9 | 8.04, m | 7‴ | 130.0 | 8.07, d (7.8) |
| | | | 3-OH | - | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 4-OH | - | 3.89, s | | | | | | | | | | | | |
| | | | 5-OH | - | 3.70, d (8.0) | | | | | | | | | | | | |

ANNEXE 10

# Données RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ des trigocherrines de *Trigonostemon cherrieri*

Soulevez la page S. V. P.

**Tableau 22. Données RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ des trigocherriolides de *Trigonostemon cherrieri* (150 MHz, $CDCl_3$)**

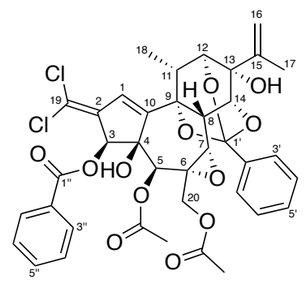
| | **Trigocherriolide A (118)** | | **Trigocherriolide B (119)** | | | **Trigocherriolide C (120)** | | | **Trigocherriolide D (121)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ***Squelette Daphnane*** | | | | | | |
| no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ | no. | $\delta_C$ | $\delta_H$ |
| 1 | 126.0 | 6.41, s | 1 | 125.9 | 6.45, s | 1 | 125.7 | 6.38, s | 1 | 126.4 | 6.28, s |
| 2 | 139.9 | - | 2 | 139.9 | - | 2 | 140.0 | - | 2 | 137.4 | - |
| 3 | 78.7 | 5.18, s | 3 | 78.9 | 5.28, s | 3 | 78.7 | 5.17, s | 3 | 79.0 | 5.42, s |
| 4 | 83.7 | - | 4 | 83.9 | - | 4 | 83.6 | - | 4 | 83.7 | - |
| 5 | 71.5 | 3.91, s | 5 | 72.2 | 3.93, br s | 5 | 70.8 | 3.85, s | 5 | 73.0 | 3.99, br s |
| 6 | 61.2 | - | 6 | 61.0 | - | 6 | 61.4 | - | 6 | 61.0 | - |
| 7 | 62.9 | 3.08, s | 7 | 62.8 | 3.35, s | 7 | 62.7 | 2.94, s | 7 | 62.7 | 3.37, s |
| 8 | 34.6 | 4.44, br s | 8 | 34.9 | 4.66, br s | 8 | 34.5 | 4.40, br s | 8 | 34.8 | 4.69, br s |
| 9 | 74.7 | - | 9 | 74.8 | - | 9 | 74.8 | - | 9 | 74.9 | - |
| 10 | 148.9 | - | 10 | 149.4 | - | 10 | 149.4 | - | 10 | 150.1 | - |
| 11 | 35.1 | 2.73, q (7.1) | 11 | 35.0 | 2.67, m | 11 | 35.0 | 2.78, m | 11 | 35.0 | 2.66, m |
| 12 | 79.6 | 4.26, br s | 12 | 79.8 | 4.25, br s | 12 | 79.7 | 4.25, br s | 12 | 79.8 | 4.24, br s |
| 13 | 72.4 | - | 13 | 72.3 | - | 13 | 72.5 | - | 13 | 72.3 | - |
| 14 | 80.0 | 4.64, br s | 14 | 79.3 | 4.34, br s | 14 | 80.1 | 4.68, br s | 14 | 79.3 | 4.34, br s |
| 15 | 77.2 | - | 15 | 75.9 | - | 15 | 77.5 | - | 15 | 75.9 | - |
| 16 | 37.4 | 1.82, dd (15.0, 4.5) | 16 | 38.8 | 1.66, d (14.0) | 16 | 37.6 | 1.81, d (15.0) | 16 | 38.6 | 1.67, d (13.2) |
| | | 1.53, dd (15.0, 4.5) | | | 1.46, d (14.0) | | | 1.50, d (15.0) | | | 1.44, d (13.2) |
| 17 | 68.2 | 4.79, d (12.1) | 17 | 23.9 | 1.36, s | 17 | 68.7 | 4.73, br s | 17 | 24.0 | 1.36, s |
| | | 4.71, d (12.1) | | | | | | | | | |
| 18 | 14.0 | 1.20, d (7.0) | 18 | 14.0 | 1.20, d (7.0) | 18 | 14.0 | 1.18, d (6,7) | 18 | 14.0 | 1.18, d (7.0) |
| 19 | 115.2 | 6.07, s | 19 | 114.8 | 6.04, s | 19 | 114.8 | 6.01, s | 19 | 118.3 | - |
| 20 | 65.5 | 3.63, d (12.3) | 20 | 65.1 | 3.82, m | 20 | 65.2 | 3.51, d (12.1) | 20 | 64.8 | 3.86, m |
| | | 3.29, d (12.3) | | | 3.75, m | | | 3.07, d (12.1) | | | 3.75, m |
| $1'$ | 108.7 | - | $1'$ | 108.7 | - | $1'$ | 108.7 | - | $1'$ | 108.7 | - |
| $2'$ | 138.4 | - | $2'$ | 138.7 | - | $2'$ | 138.6 | - | $2'$ | 138.6 | - |
| $3'$ | 125.4 | 7.70, m | $3'$ | 125.5 | 7.72, m | $3'$ | 125.4 | 7.70, m | $3'$ | 125.5 | 7.70, m |
| $4'$ | 128.4 | 7.38, m | $4'$ | 128.4 | 7.37, m | $4'$ | 128.4 | 7.37, m | $4'$ | 128.4 | 7.37, m |
| $5'$ | 129.8 | 7.38, m | $5'$ | 129.7 | 7.37, m | $5'$ | 129.7 | 7.37, m | $5'$ | 129.7 | 7.37, m |
| $6'$ | 128.4 | 7.38, m | $6'$ | 128.4 | 7.37, m | $6'$ | 128.4 | 7.37, m | $6'$ | 128.4 | 7.37, m |
| $7'$ | 125.4 | 7.70, m | $7'$ | 125.5 | 7.72, m | $7'$ | 125.4 | 7.70, m | $7'$ | 125.5 | 7.70, m |
| | | | | | ***Substituants*** | | | | | | |
| $1''$ | 177.8 | - | $1''$ | 178.3 | - | $1''$ | 177.9 | - | $1''$ | 178.3 | - |
| $2''$ | 41.8 | 2.43, m | $2''$ | 42.1 | 2.41, m | $2''$ | 42.1 | 2.40, m | $2''$ | 42.7 | 2.46, m |
| $3''$ | 35.1 | 1.65, m 1.31, m | $3''$ | 35.1 | 1.64, m 1.33, m | $3''$ | 35.1 | 1.63, m 1.29, m | $3''$ | 35.3 | 1.66, m 1.34, m |
| $4''$ | 31.1 | 1.68 – 1.23, m | $4''$ | 31.5 | 1.68 – 1.23, m | $4''$ | 31.2 | 1.41– 1.11, m | $4''$ | 31.7 | 1.63 – 1.23, m |
| $5''$ | 26.7 | 1.68 – 1.23, m | $5''$ | 27.1 | 1.68 – 1.23, m | $5''$ | 27.2 | 1.41– 1.11, m | $5''$ | 27.3 | 1.63 – 1.23, m |
| $6''$ | 29.2 | 1.68 – 1.23, m | $6''$ | 28.8 | 1.68 – 1.23, m | $6''$ | 29.0 | 1.41– 1.11, m | $6''$ | 28.9 | 1.63 – 1.23, m |
| $7''$ | 27.2 | 1.68 – 1.23, m | $7''$ | 27.7 | 1.68 – 1.23, m | $7''$ | 27.8 | 1.41– 1.11, m | $7''$ | 28.0 | 1.63 – 1.23, m |
| $8''$ | 38.6 | 1.38, m | $8''$ | 38.2 | 1.36, m | $8''$ | 38.5 | 1.33, m | $8''$ | 38.2 | 1.38, m |
| | | 1.28, m | | | 1.20, m | | | 1.27, m | | | 1.18, m |
| $9''$ | 27.8 | 1.68, m | $9''$ | 25.8 | 1.59, m | $9''$ | 26.5 | 1.72, m | $9''$ | 25.7 | 1.55, m |
| $10''$ | 24.7 | 1.14, d (6.6) | $10''$ | 25.1 | 1.01, d (6.5) | $10''$ | 24.6 | 1.03, d (5.9) | $10''$ | 25.0 | 1.01, d (6.3) |
| $11''$ | 18.8 | 1.14, d (7.0) | $11''$ | 18.8 | 1.16, d (7.0) | $11''$ | 18.8 | 1.13, d (6.7) | $11''$ | 19.3 | 1.20, d (7.0) |
| $1'''$ | 171.1 | - | | | | $1'''$ | 168.5 | - | | | |
| $2'''$ | 112.0 | - | | | | $2'''$ | 129.5 | - | | | |
| $3'''$ | 162.1 | - | | | | $3'''$ | 129.9 | 8.01, d (7.2) | | | |
| $4'''$ | 118.4 | 7.02, d (8.3) | | | | $4'''$ | 128.9 | 7.46, t (7.2) | | | |
| $5'''$ | 136.8 | 7.49, ddd (8.3, 7.3, 1.5) | | | | $5'''$ | 134.0 | 7.59, t (7.2) | | | |
| $6'''$ | 119.8 | 6.92, ddd (8.3, 7.3, 1.5) | | | | $6'''$ | 128.9 | 7.46, t (7.2) | | | |
| $7'''$ | 129.6 | 7.74, dd (8.3, 1.5) | | | | $7'''$ | 129.9 | 8.01, d (7.2) | | | |

ANNEXE 11

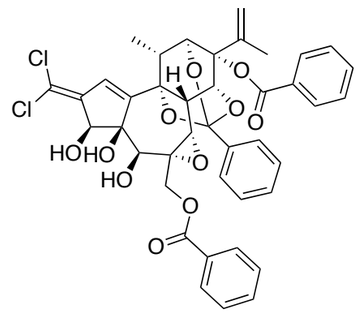
# Données RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ des trigocherriolides de *Trigonostemon cherrieri*

Soulevez la page S. V. P.

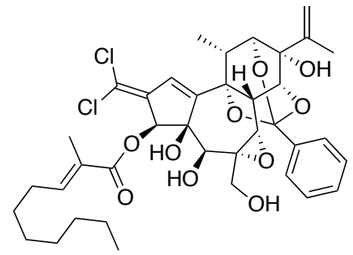
## Composés isolées des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*



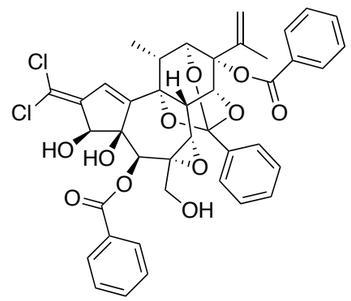
Trigocherrine A (**112**)



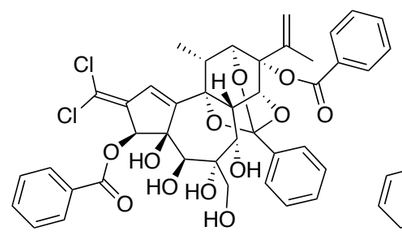
Trigocherrine B (**113**)



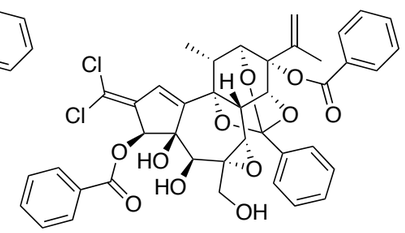
Trigocherrine C (**114**)



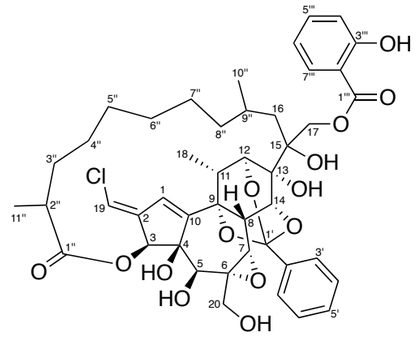
Trigocherrine D (**115**)



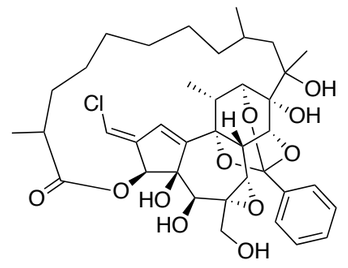
Trigocherrine E (**116**)



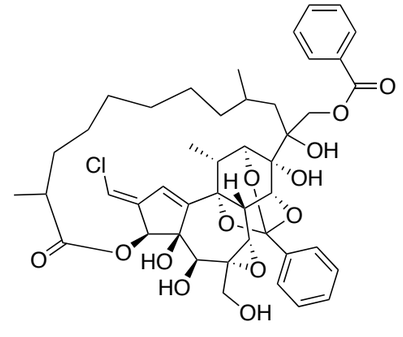
Trigocherrine F (**117**)



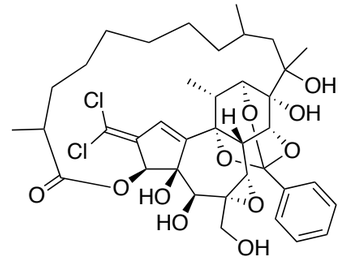
Trigocherriolide A (**118**)



Trigocherriolide B (**119**)



Trigocherriolide C (**120**)



Trigocherriolide D (**121**)

ANNEXE 12

# Composés isolés des écorces et bois de *Trigonostemon cherrieri*

Soulevez la page S. V. P.

# Publications

JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

Article

pubs.acs.org/jnp

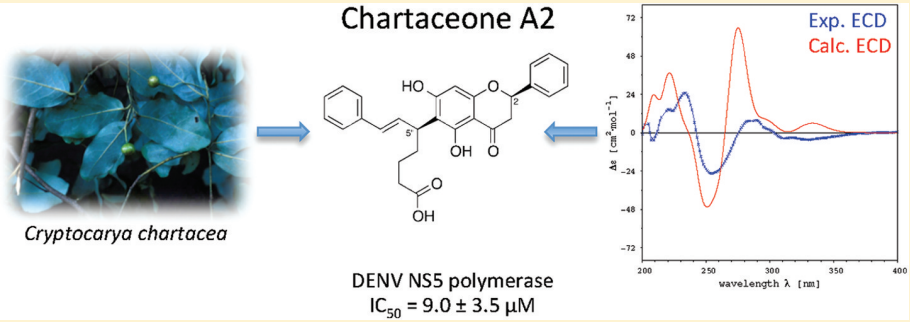
# Alkylated Flavanones from the Bark of *Cryptocarya chartacea* As Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors

Pierre-Marie Allard,[†] Elise Tran Huu Dau,[†] Cécilia Eydoux,[‡] Jean-Claude Guillemot,[‡] Vincent Dumontet,[†] Cyril Poullain,[†] Bruno Canard,[‡] Françoise Guéritte,[†] and Marc Litaudon*[,†]

[†]Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

[‡]AFMB, Aix-Marseille University, CNRS, UMR 6098, ESIL 13228, Marseille, France

Supporting Information




**ABSTRACT:** An in vitro screening of New Caledonian plants allowed the selection of several species with a significant dengue virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibiting activity. The chemical investigation of *Cryptocarya chartacea* led to the isolation of a series of new mono- and dialkylated flavanones named chartaceones A−F (**1**−**6**), along with pinocembrin. They were isolated as racemic mixtures and characterized using extensive one- and two-dimensional NMR spectroscopy. Four diastereomers of chartaceone A (**1**) were separated using chiral HPLC, and their absolute configurations were established by comparison of their experimental and calculated ECD spectra. The dialkylated flavanones, chartaceones C−F (**3**−**6**), exhibited the most significant NS5 RdRp inhibiting activity, with $IC_{50}$ ranging from 1.8 to 4.2 $\mu$M. Chartaceones represent a new class of non-nucleosidic inhibitors of the DENV NS5 RdRp.

The dengue virus (DENV) is responsible for dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF), which are increasingly important public health problems in tropical and subtropical regions.[1] Worldwide, an estimated 2.5 billion people are at risk of infection and about 500 million infections occur each year, including 500 000 hospitalizations for DHF and 20 000 deaths.[2] Despite the importance of this disease, no vaccine or specific antiviral is available.[3] The development of an effective therapeutic agent against DENV is crucial. The RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain of the non-structural protein 5 (NS5) of the DENV appears as a promising target for new drugs since polymerase activity is essential for viral replication and human host cells are devoid of such RdRp activity.[4] To date, *N*-sulfonylanthranilic acid derivatives are the only non-nucleosidic DENV NS5 polymerase inhibitors that have been reported.[5] Thus, there is an urgent need for the discovery of new efficient antiviral agents targeting the DENV to treat this disease.

In this context, a biological screening was conducted on 1350 EtOAc extracts prepared from various parts of approximately 650 New Caledonian plants using an assay[6] adapted to high-throughput format. Among the active extracts, the bark of *Cryptocarya chartacea* Kosterm., an endemic species of the family Lauraceae, was selected for chemical investigation due to its high potency.

Various secondary metabolites such as alkaloids,[7,8] $\alpha$-pyrones,[9,10] and simple[11] and complex[12−14] flavonoids have been isolated from several *Cryptocarya* species. Some of them have shown interesting biological properties such as antiviral,[15,16] cytotoxic,[17] or apoptosis inducer activities.[18]

In this paper, we report the isolation, characterization, and biological activities of pinocembrin and chartaceones A−F (**1**−**6**), a series of new 6-mono- and 6,8-dialkylated flavanones. The absolute configuration of four diastereomers of chartaceone A (**1a**−**d**) is also detailed.

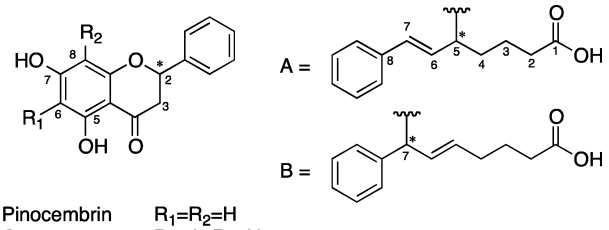
## RESULTS AND DISCUSSION

Approximately 1350 EtOAc extracts previously filtered on polyamide cartridges were screened at 50 $\mu$g/mL on a dengue polymerase assay using the RdRp domain of the DENV-2 NS5 protein.[6] A second screen at 10 $\mu$g/mL was carried out on 320

**Received:** September 1, 2011
**Published:** November 3, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy

selected active extracts, of which 49 exhibited an enzyme inhibition of ≥80%. Interestingly, among these active extracts, several species of the genus *Cryptocarya* were found to possess a strong interaction with RNA polymerase, the EtOAc bark extract of *C. chartacea* showing significant antiviral activity (90% at 10 μg/mL). This extract was subjected to $C_{18}$ flash chromatography eluted with a $H_2O$–MeOH gradient to afford 12 fractions. Subsequent semipreparative and preparative HPLC on the active fractions afforded the known pinocembrin and chartaceones A–F (**1**–**6**). All the compounds were isolated as optically inactive mixtures.




| | | |
|---|---|---|
| | Pinocembrin | $R_1$=$R_2$=H |
| **1** | Chartaceone A | $R_1$=A, $R_2$=H |
| **1a** | Chartaceone A1 | 2*R*,5"*R* |
| **1b** | Chartaceone A2 | 2*R*,5"*S* |
| **1c** | Chartaceone A3 | 2*S*,5"*R* |
| **1d** | Chartaceone A4 | 2*S*,5"*S* |
| **2** | Chartaceone B | $R_1$=B, $R_2$=H |
| **3** | Chartaceone C | $R_1$=$R_2$=B |
| **4** | Chartaceone D | $R_1$=B, $R_2$=A |
| **5** | Chartaceone E | $R_1$=A, $R_2$=B |
| **6** | Chartaceone F | $R_1$=$R_2$=A |

Chartaceones A (**1**) and B (**2**) were obtained as yellow, amorphous solids. The same molecular formula, $C_{28}H_{26}O_6$, for chartaceones A (**1**) and B (**2**) was deduced from their HR-ESIMS quasi-molecular ion peak $[M - H]^-$ at *m*/*z* 457.1671 and 457.1653, respectively (calcd 457.1651). The UV spectra of chartaceones A (**1**) and B (**2**) showed absorption bands at 290 and 340 nm (shoulder) consistent with a flavanone core,[19] but with an additional absorption band at 250 nm, indicating the presence of a styrene moiety[20] in the case of chartaceone A (**1**). The flavanone moiety was confirmed in the $^1$H NMR spectra (see Table 1) by the presence of a typical ABX system for H-2 and H-3 ($\delta_H$ 5.43, dd, *J* = 12.9 and 3.1 Hz, $\delta_H$ 2.75, dd, *J* = 17.1 and 3.1 Hz, and $\delta_H$ 3.08, dd, *J* = 17.1 and 12.9 Hz) for chartaceone A (**1**) and ($\delta_H$ 5.44, dd, *J* = 12.9 and 3.1 Hz, $\delta_H$ 2.75, dd, *J* = 17.1 and 3.1 Hz, and $\delta_H$ 3.09, dd, *J* = 17.1 and 12.9 Hz) for chartaceone B (**2**). Other NMR data (see Tables 1 and 2) are consistent with the presence of a pinocembrin carbon skeleton substituted by an arylheptanoid side chain at C-6, but with slight differences between chartaceones A and B (**1** and **2**). Indeed, HSQC, HMBC, and COSY correlations (Figure 1)

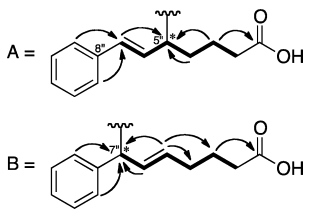



**Figure 1.** Key COSY (bold) and HMBC (arrows) correlations for side chains A and B (in compounds **1** and **2**, respectively).

indicated that the side chain is an (*E*)-7-phenylhept-6-enoic acid moiety coupled at C-5 (type A) and an (*E*)-7-phenylhept-5-enoic acid moiety coupled at C-7 (type B) for chartaceones A (**1**) and B (**2**), respectively. The substitution of the pinocembrin core at C-6 was confirmed by the following evidence: cross-peaks from C-5, C-6, and C-10 to the hydrogen-bonded OH-5 at ca. $\delta_H$ 12.50 and from C-5, C-6, and C-7 to the methine H-5" ($\delta_H$ 4.05, q, *J* = 8.0 Hz) for chartaceone A (**1**) or H-7" ($\delta_H$ 5.33, d, *J* = 8.5 Hz) for chartaceone B (**2**) were observed in the HMBC spectra of **1** and **2** (run in $CDCl_3$). The geometry of the $\Delta^6$ (**1**) and $\Delta^5$ (**2**) double bonds was assigned as *E* on the basis of the large coupling constant between H-6" and H-7" (*J* = 15.9 Hz) and between H-5" and H-6" (*J* = 15.2 Hz), respectively. Chartaceones A (**1**) and B (**2**) were optically inactive and thus racemic.

The racemic mixture of chartaceone A (**1**) (85 mg) was subjected to chiral semipreparative HPLC (chromatogram in Supporting Information) to afford four diastereomers obtained in a 1:1:1:1 ratio (ca. 20 mg each), chartaceones A1–A4 (**1a**–**d**), named by order of elution. Their absolute configurations were assigned by comparison of experimental and calculated ECD spectra. Two pairs of mirror-imaged ECD curves revealed the enantiomeric nature of chartaceones A1 and A4 (**1a** and **1d**) and A2 and A3 (**1b** and **1c**) (Figure 2).

The CD spectra of compounds **1a**–**d** showed four Cotton effects (CE) (Figure 2). Transitions due to the aryl ketone chromophore[21] of 2*S*-flavanones generate a positive CE in the n→π* region (320–330 nm) and a negative CE in the π→π* region (280–290 nm) of their ECD spectra, as shown by Gaffield.[22] From the ECD spectra of chartaceones A1 (**1a**) and A2 (**1b**), which showed a negative CE at ca. 330 nm and a positive CE at ca. 290 nm, it could be deduced that both possess an *R* configuration at C-2, and chartaceones A3 (**1c**) and A4 (**1d**) conversely possess an *S* configuration at C-2. The comparison of the ECD spectra of chartaceones A1–A4 (**1a**–**d**) with that of 2*S*-pinocembrin[23] suggested that the observed CE at lower wavelengths (ca. 250 and 230 nm) originated from the chirality at C-5" of the arylheptanoid side chain.

Time-dependent density functional theory at the B3LYP/6-31G** level has been shown to be a powerful method for calculating the ECD spectra of flavonoids.[24,25] Therefore, theoretical calculations were engaged to determine the contribution of chirality at C-5" for chartaceones A1–A4 (**1a**–**d**).

A conformational study was undertaken on (2*R*,5"*R*)- and (2*R*,5"*S*)-configured chartaceones A. After selection of the lowest energy conformers, overall ECD curves for both configurations were simulated. Calculated molecular orbitals of these structures confirmed that the diagnostic CEs at 250 nm and 220–230 nm originated by electronic perturbation of the styrene chromophore at C-5". Quantum chemically predicted ECD and experimental spectra of 2*R*,5"*R*-chartaceone A1 (**1a**) and 2*R*,5"*S*-chartaceone A2 (**1b**) are shown Figure 3. In the 350–280 nm region, mainly influenced by the C-2 chirality, the adequacy of calculated and experimental ECD curves for chartaceones A1 (**1a**) and A2 (**1b**) is approximate. On the other hand, in the lower wavelength part of the spectrum, supposedly influenced by the styrene chromophore at C-5", a positive CE at ca. 255 nm and negative CE at ca. 220 nm were observed for the calculated ECD curve of the 2*R*,5"*R*-configured compound and experimental ECD curve of compound **1a**, indicating that the absolute configuration of chartaceone A1 (**1a**) could be assigned as 2*R*,5"*R*. Likewise, similar experimental and calculated ECD curves for compound **1b** (2*R*,5"*S*-configured compound) allowed the absolute configuration of chartaceone A2 (**1b**) to be assigned as 2*R*,5"*S*. From these results and taking into account that compounds **1a** and

Table 1. $^1$H NMR Data (methanol-$d_4$, 300 MHz) for Chartaceones A (1a–d)[a] and B–F (2–6)[b]

| | 1a–d | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| position | $\delta_H$ ($J$ in Hz) | $\delta_H$ ($J$ in Hz) | $\delta_H$ ($J$ in Hz) | $\delta_H$ ($J$ in Hz) | $\delta_H$ ($J$ in Hz) | $\delta_H$ ($J$ in Hz) |
| 2[c] | 5.43, dd (12.9, 3.1) | 5.44, dd (12.9, 3.1) | 5.09, d (13.0) | 5.51, d (12.9) | 5.12, m | 5.44, d (12.9) |
| | | | 5.39, d (12.7) | 5.41, d (12.9) | 5.42, d (13.0) | 5.33, d (12.9) |
| 3$\alpha$ | 2.75, dd (17.1, 3.1) | 2.75, dd (17.1, 3.1) | 2.71, d (16.6) | 2.78, d (16.9) | 2.75, d (16.6) | 2.75, d (16.9) |
| 3$\beta$[c] | 3.08, dd (17.1, 12.9) | 3.09, dd (17.1, 12.9) | 2.86, dd (16.6, 13.0) | 3.09, dd (16.9, 12.9) | 2.90, m | 3.03, dd (16.9, 12.9) |
| | | | 3.05, dd (16.6, 12.7) | 3.16, dd (16.9, 12.9) | 3.08, dd (16.6, 13.0) | 3.11, dd (16.9, 12.9) |
| 8 | 6.00, s | 6.00. s | | | | |
| 2′ | 7.48, d (8.0) | 7.49, d (8.0) | 7.10–7.29, m | 7.53, d (7.0) | 7.07–7.33, m | 7.49, d (7.1) |
| 3′ | 7.35–7.43 | 7.32–7.44 | 7.10–7.29, m | 7.36–7.46, m | 7.07–7.33, m | 7.41, t (7.1) |
| 4′ | 7.35–7.43 | 7.32–7.44 | 7.10–7.29, m | 7.36–7.46, m | 7.07–7.33, m | 7.37, m |
| 5′ | 7.35–7.43 | 7.32–7.44 | 7.10–7.29, m | 7.36–7.46, m | 7.07–7.33, m | 7.41, t (7.1) |
| 6′ | 7.48, d (8.0) | 7.49, d (8.0) | 7.10–7.29, m | 7.53, d (7.0) | 7.07–7.33, m | 7.49, d (7.1) |
| 2″ | 2.30, m | 2.31, t (7.2) | 2.15–2.36, m | 2.30, m | 2.37, m | 2.20–2.34, m |
| 3″ | 1.57, m | 1.71, qt (7.2) | 1.57–1.76, m | 1.71, m | 1.56–1.65, m | 1.50–1.67, m |
| 4″ | 1.87, m | 2.14, q (7.2) | 2.00–2.22, m | 2.17, m | 1.95–2.04, m | 1.91–2.08, m |
| | 2.03, m | | | | | |
| 5″ | 4.05, q (8.5) | 5.56, ddd (15.2, 8.7, 7.2) | 5.45–5.65, m | 5.60, m | 4.05, m | 4.06, m |
| 6″[c] | 6.74, dd (15.9, 8.5)[d] | 6.31, dd (15.2, 8.7) | 5.99–6.18, m | 6.28, m | 6.43, d (16) | 6.73–6.80, m |
| | 6.72, dd (15.9, 8.5)[e] | 6.30, dd (15.2, 8.7) | | | | |
| 7″ | 6.41, d (15.9) | 5.16, d (8.7) | 5.18, d (7.4) | 5.26, m | 6.8, m | 6.44, d (15.7) |
| 9″ | 7.32, d (7.4) | 7.15–7.25 | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.25–7.34, m |
| 10″ | 7.24, t (7.4) | 7.15–7.25 | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.20–7.24, m |
| 11″ | 7.13, t (7.4) | 7.08, t (7.3) | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.08–7.16, m |
| 12″ | 7.24, t (7.4) | 7.15–7.25 | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.20–7.24, m |
| 13″ | 7.32, d (7.4) | 7.15–7.25 | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.25–7.34, m |
| 2‴ | | | 2.15–2.36, m | 2.25, m | 2.22, m | 2.20–2.34, m |
| 3‴ | | | 1.57–1.76, m | 1.55, m | 1.67, m | 1.50–1.67, m |
| 4‴ | | | 2.00–2.22, m | 1.85–1.98, m | 2.06–2.12, m | 1.70–1.90, m |
| 5‴ | | | 5.45–5.65, m | 3.98, m | 5.56, m | 4.01, m |
| 6‴[c] | | | 6.22–6.34, m | 6.55–6.63, m | 6.10, m | 6.56, dd (15.9, 7.6) |
| | | | | | | 6.65, dd (15.9, 7.6) |
| 7‴[c] | | | 5.26, d (7.5) | 6.32, d (16.8) | 5.20, m | 6.33, d (15.9) |
| | | | | 6.35, d (16.8) | | 6.36, d (15.9) |
| 9‴ | | | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.25–7.34, m |
| 10‴ | | | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.20–7.24, m |
| 11‴ | | | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.08–7.16, m |
| 12‴ | | | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.20–7.24, m |
| 13‴ | | | 7.10–7.29, m | 7.08–7.30, m | 7.07–7.33, m | 7.25–7.34, m |

[a]NMR data for optically pure chartaceones **1a–d**. [b]NMR data for diastereomeric mixtures. [c]Possibility of the presence of two sets of signals of equal intensity for compounds **3–6**. [d]Chemical shifts for chartaceones **1a** and **1d**. [e]Chemical shifts for chartaceones **1b** and **1c**.

**1d**, and **1b** and **1c** are enantiomers, the absolute configuration of chartaceones A3 (**1c**) and A4 (**1d**) could be assigned as 2*S*,5″*R* and 2*S*,5″*S*, respectively.

Chartaceone B (**2**) (44.9 mg) was similarly subjected to chiral semipreparative HPLC to afford the four diastereomeric chartaceones B1–B4 in a 1:1:1:1 ratio (ca. 10 mg each). Two pairs of mirror-imaged ECD curves (see Supporting Information) revealed the enantiomeric nature of chartaceones B1 and B4, and B2 and B3. As it is the case for chartaceones A1–A4, the absolute configuration at C-2 could be assigned as 2*R* (chartaceones B1 and B2) and 2*S* (chartaceones B3 and B4) from the CEs observed at 320 and 290 nm. On the other hand, the lack of clear CEs in the 250 nm region due to the absence of a styrene moiety did not allow assignment of the absolute configuration at C-7″.

Chartaceones C–F (**3–6**) were obtained as yellow to brownish, amorphous powders with the molecular formula $C_{41}H_{40}O_8$ being established by HR-ESIMS. It could be deduced from the molecular formula and spectroscopic data that compounds **3–6**, in addition to the arylheptanoid moieties at C-6, possess an additional arylheptanoid side chain at C-8. The comparison of the overall $^1$H and $^{13}$C NMR data (Tables 1 and 2) of compounds **3–6** with those of **1** and **2** revealed substantial similarities, indicating that the additional side chain was either (*E*)-7-phenylhept-6-enoic acid or (*E*)-7-phenylhept-5-enoic acid. The lack of optical activity and the presence of three stereogenic centers suggested the racemic nature of chartaceones C–F (**3–6**). Several attempts of purification of the diastereomers using various chiral and nonchiral columns were unsuccessful. Thus, chartaceones C–F (**3–6**) are described as diastereomeric mixtures.

The absence of an absorption band at ca. 250 nm for a styrene moiety in the UV spectrum and the presence of two methine protons at $\delta_H$ 5.18 and 5.26 (H-7″ and H-7‴, respectively) in the $^1$H NMR spectrum of chartaceone C (**3**) indicated substitution by two 7-phenylhept-5-enoic acid moieties. The location of the side chains was supported by


dx.doi.org/10.1021/np200715v|*J. Nat. Prod.* 2011, 74, 2446–2453

Table 2. $^{13}$C NMR Data (methanol-$d_4$, 75 MHz) for Chartaceones A (1a–d)[a] and B–F (2–6)[b]

| | 1a–d | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| position | $\delta_C$ | $\delta_C$ | $\delta_C$ | $\delta_C$ | $\delta_C$ | $\delta_C$ |
| 2[c] | 80.6 | 80.6 | 80.2 | 80.6 and 80.9 | 80.2 | 80.5 and 80.8 |
| 3[c] | 44.5 | 44.5 | 44.8 | 44.5 and 44.7 | 44.2 and 44.8 | 44.6 and 44.7 |
| 4[c] | 197.7 | 197.7 | 198.3 and 198.6 | 198.5 and 198.7 | 198.4 and 198.7 | 198.5 and 198.8 |
| 5[c] | 163.1 | 163 | 161.3 | 161.1 and 161.2 | 161.7 | 161.5 and 161.6 |
| 6[c] | 111.6 | 112.6 | 112.1 and 112.2 | 112.7 | 112.5 | 112.3 |
| 7[c] | 166.4 | 166.1 | 162.9 and 163 | 163.2 | 163.1 and 163.2 | 163.2 and 163.3 |
| 8[c] | 96.1 | 96.1 | 112.5 and 112.7 | 111.7 | 111.8 | 111.5 and 111.8 |
| 9[c] | 162.8 | 162.8 | 160.1 and 160.3 | 160.5 and 160.7 | 160.1 | 160.3 and 160.4 |
| 10[c] | 103.5 | 103.5 | 104.2 and 104.4 | 104.3 | 104.1 and 104.4 | 104.1 and 104.3 |
| 1′[c] | 140.7 | 140.7 | 140.1 and 140.6 | 140.6 and 140.8 | 140.4 | 140.6 and 140.9 |
| 2′ | 127.5 | 127.5 | 126.8 −129.6 | 127.7 | 126.8–129.7 | 127.6 |
| 3′ | 129.8 | 129.8 | 126.8 −129.6 | 129.7–130 | 126.8–129.7 | 129.9 |
| 4′ | 129.7 | 129.7 | 126.8 −129.6 | 129.7–130 | 126.8–129.7 | 129.8 |
| 5′ | 129.8 | 129.8 | 126.8 −129.6 | 129.7–130 | 126.8–129.7 | 129.9 |
| 6′ | 127.5 | 127.5 | 126.8 −129.6 | 127.7 | 126.8–129.7 | 127.6 |
| 1″ | 178.5 | 178.1 | 178.0 | 178.4 | 178.6 | 178.6 |
| 2″ | 35.5 | 34.6 | 34.7 | 34.9 | 35.6 | 35.6 |
| 3″[c] | 25 | 26.1 | 26.0 and 26.1 | 26.2 | 25 | 24.8 and 25 |
| 4″[c] | 33.7[e] | 33.1 | 33.0 and 33.1 | 33.1 | 33.7 and 33.8 | 33.7 and 33.8 |
| | 33.8[d] | | | | | |
| 5″ | 39.5 | 131.8 | 132.5 and 133.0 | 132.6 and 133 | 40 | 39.9 |
| 6″[c] | 134.1[d] | 133.1 | 132.5 and 133.0 | 132.6 and 133 | 130.8 and 130.9 | 133.8 and 133.9 |
| | 134.2[e] | | | | | |
| 7″[c] | 130.5 | 43.9 | 44.2 and 44.3 | 43.9 | 133.9 | 130.9 |
| 8″[c] | 139.7 | 145.6 | 145.0 and 145.1 | 144.6 | 139.5 | 139.4 and 139.5 |
| 9″ | 127.2 | 128.7 | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.3 |
| 10″ | 129.6 | 128.8 | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 129.6 |
| 11″ | 127.9 | 126.5 | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.9–128.0 |
| 12″ | 129.6 | 128.8 | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 129.6 |
| 13″ | 127.2 | 128.7 | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.3 |
| 1‴ | | | 178.0 | 178.4 | 178.0 | 178.6 |
| 2‴ | | | 34.7 | 35.5 | 34.9 and 35 | 35.6 |
| 3‴[c] | | | 26.0 and 26.1 | 24.8 and 24.9 | 26.1 | 24.8 and 25 |
| 4‴[c] | | | 33.0 and 33.1 | 34.0 and 34.2 | 33 and 33.1 | 34.0 and 34.2 |
| 5‴[c] | | | 132.5 and 133.0 | 39.7 | 132.5 and 132.9 | 39.7 and 39.8 |
| 6‴[c] | | | 132.5 and 133.0 | 134.1 and 134.2 | 132.5 and 132.9 | 134.2 and 134.3 |
| 7‴ | | | 44.0 | 130.6 | 44.3 | 130.6 |
| 8‴[c] | | | 144.6 and 144.7 | 139.4 and 139.5 | 145.2 and 145.3 | 139.4 and 139.5 |
| 9‴ | | | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.3 |
| 10‴ | | | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 129.6 |
| 11‴ | | | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.9–128.0 |
| 12‴ | | | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 129.6 |
| 13‴ | | | 126.8–129.6 | 127.0–130.0 | 126.8–129.7 | 127.3 |

[a]NMR data for optically pure chartaceones **1a–d**. [b]NMR data for diastereomeric mixtures. [c]Possibility of the presence of two sets of signals of equal intensity. [d]Chemical shifts for chartaceones **1a** and **1d**. [e]Chemical shifts for chartaceones **1b** and **1c**.

the HMBC correlations of H-7″ and H-7‴ with C-6 and C-8, respectively.

An absorption band at ca. 250 nm in the UV spectrum of chartaceone F (**6**), together with the presence of two methine protons at $\delta_H$ 4.06 and 4.01 (H-5″ and H-5‴, respectively) in its $^1$H NMR spectrum, suggested substitution by two 7-phenylhept-6-enoic acid moieties. The location of the side chains was supported by the HMBC correlations of H-5″ and H-5‴ with C-6 and C-8, respectively.

Planar structures of chartaceones D (**4**) and E (**5**) were obtained through the following evidence. In the $^1$H NMR spectrum of chartaceones D (**4**) and E (**5**), typical signals at $\delta_H$ 3.98 and 5.26 (compound **4**, H-5‴ and H-7″, respectively) and $\delta_H$ 4.05 and 5.20 (compound **5**, H-5″ and H-7‴, respectively) for methine protons of a 7-phenylhept-5-enoic acid and a 7-phenylhept-6-enoic acid moiety were observed. In the HMBC spectrum of **4** in DMF-$d_7$, cross-peaks between H-7″ and the hydrogen-bonded OH at $\delta_H$ 13.14, and the quaternary C-5 ($\delta_c$ 161.0) and C-6 ($\delta_c$ 113.3), confirmed that the 7-phenylhept-5-enoic acid and the 7-phenylhept-6-enoic acid moiety were located at C-6 and C-8, respectively. In the HMBC spectrum of **5** in DMF-$d_7$, cross-peaks between H-5″ and the hydrogen-bonded OH at $\delta_H$ 13.12, and the quaternary C-5 ($\delta_C$ 161.7) and C-6 ($\delta_C$ 112.7), confirmed that the 7-phenylhept-6-enoic acid moiety was located at C-6, and the 7-phenylhept-5-enoic acid moiety at C-8 (HMBC spectrum in the Supporting Information).


dx.doi.org/10.1021/np200715v|J. Nat. Prod. 2011, 74, 2446–2453

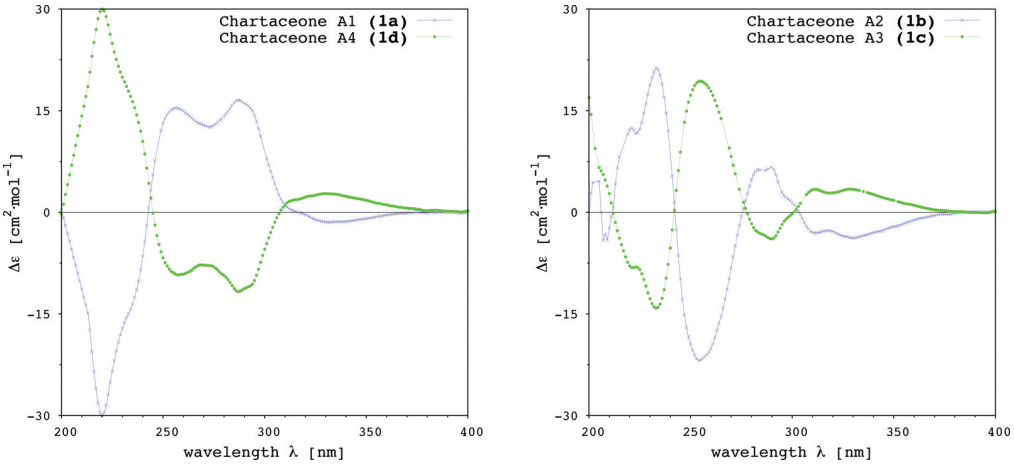



**Figure 2.** Experimental ECD curves of chartaceones A1−A4 (**1a**−**d**).

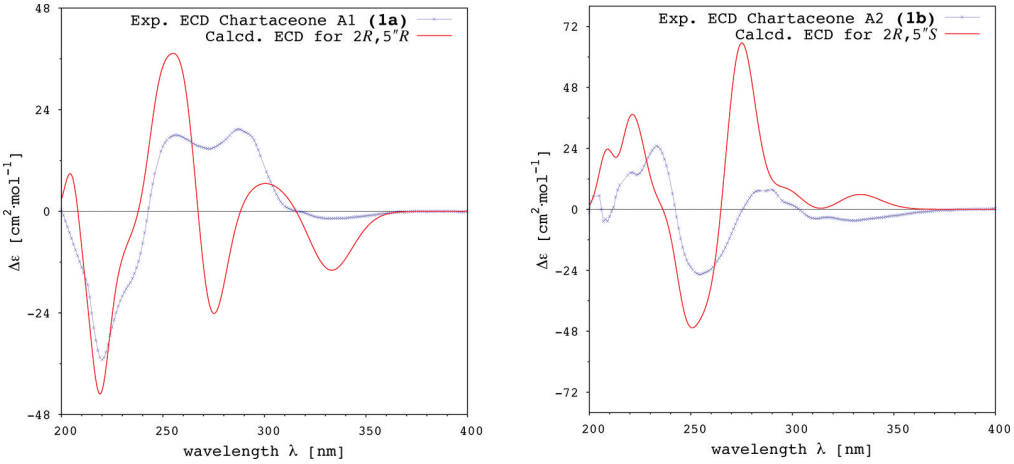



**Figure 3.** Left: Experimental and calculated ECD curves of chartaceone A1 (**1a**) and 2*R*,5″*R*-configured chartaceone A. Right: Experimental and calculated ECD curves of chartaceone A2 (**1b**) and 2*R*,5″*S*-configured chartaceone A.

In a similar way to calyxin A and B biosynthesis,[26] chartaceones A−F could be formed from the condensation of pinocembrin with an allylic intermediate originating from a phenylheptenoic acid.

Pinocembrin and all chartaceones A−F (**1**−**6**) were evaluated against DENV and bovine diarrhea virus (BVDV) NS5 polymerases (Table 3), both belonging to the family Flaviviridae. Polymerase activity was assayed by monitoring the incorporation of radiolabeled guanosine into a homopolymeric cytosine RNA template, as previously described.[6] Their cytotoxicity was also evaluated against KB cell lines.

Some interesting observations emanated from these results. Pinocembrin and chartaceones A−F (**1**−**6**) are not cytotoxic in the KB cell line at 10 μg/mL. In the DENV polymerase assay, chartaceones C−F (**3**−**6**) showed significant $IC_{50}$'s ranging from 1.8 ± 1.2 to 4.2 ± 0.1 μM, whereas chartaceones A, A1−A4 (**1**, **1a**−**d**) and B (**2**) were less active, and pinocembrine was not active, indicating that the presence of the arylheptanoid side chains at C-6 and C-8 plays an important role in the inhibition of the enzyme. In contrast, no inhibiting activity was shown for the BVDV polymerase, suggesting that the active compounds possess some selectivity toward DENV. Since the DENV polymerase inhibiting activities of compounds **3**−**6** were similar, it can be inferred that the two side chains play an equivalent role.

In conclusion, we have identified a novel series of mono- and dialkylated flavanones from the bark of *C. chartacea*, an

**Table 3. Biological Activities of Pinocembrin and Chartaceones A−F (1−6)**

| | polymerase inhibition[a] | | cytotoxicity[b] |
|---|---|---|---|
| compound | DENV | BVDV | KB |
| pinocembrin | not active | | 0 |
| Chartaceone A (**1**) | 14.8 ± 2.4 | >50 | 3.2 |
| Chartaceone A1 (**1a**) | 15.3 ± 1.4 | >50 | 0 |
| Chartaceone A2 (**1b**) | 9.0 ± 3.5 | >50 | 11 |
| Chartaceone A3 (**1c**) | 27.0 ± 6.5 | >50 | 0 |
| Chartaceone A4 (**1d**) | 7.4 ± 2.2 | >50 | 6 |
| Chartaceone B (**2**) | 72.5 ± 15.3 | >50 | 0 |
| Chartaceone C (**3**) | 4.2 ± 0.1 | >50 | 0 |
| Chartaceone D (**4**) | 1.8 ± 1.2 | >50 | 0 |
| Chartaceone E (**5**) | 2.9 ± 0.3 | >50 | 0 |
| Chartaceone F (**6**) | 2.4 ± 0.3 | >50 | 0 |
| 3′-deoxy-GTP[c] | 0.02 | <1 | |

[a]DENV and BVDV NS5 polymerases: $IC_{50}$ (μM) are mean values ± SD ($n$ = 3). [b]KB (nasopharynx human carcinoma cell line): % inhibition at 10 μg/mL. [c]3′-Deoxy GTP was used as a positive control of inhibition of both polymerases.


dx.doi.org/10.1021/np200715v|*J. Nat. Prod.* 2011, 74, 2446−2453

endemic species growing in New Caledonia. Chartaceones A–F exhibited moderate to potent enzyme-inhibiting activities on DENV NS5 polymerase and are not cytotoxic (KB cell line at 10 $\mu$g/mL). The presence of the arylheptanoid side chains at C-6 and C-8 is essential for a significant polymerase-inhibiting activity. Chartaceones represent a new class of non-nucleosidic inhibitors specific to the DENV NS5 RdRp.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured at 25 °C on a JASCO P1010 polarimeter. The UV spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 5 spectrophotometer. ECD spectra were measured at 25 °C on a JASCO J-810 spectropolarimeter. The NMR spectra were recorded on a Bruker 300 MHz instrument (Avance 300) for compounds **1**–**6** and a Bruker 500 MHz instrument (Avance 500) for compounds **1a**–**d**, using methanol-$d_4$ as solvent. Additional experiments were recorded on a Bruker 600 MHz instrument using $CDCl_3$ (**1**, **2**, and **6**) and DMF-$d_7$ (**4** and **5**) as solvents. HR-ESIMS were run on a Thermoquest TLM LCQ Deca ion-trap spectrometer. Kromasil analytical, semipreparative, and preparative $C_{18}$ columns (250 × 4.5 mm, 250 × 10 mm, and 250 × 21.2 mm; i.d. 5 $\mu$m, Thermo) were used for preparative 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. Chiralpak analytical AD-H (150 × 4.6 mm, 5 $\mu$m, Interchim) and semipreparative AD (250 × 10 mm, 10 $\mu$m, Interchim) columns were used for diastereomer separations, using Waters Alliance 2695. SFC purification was performed on a Thar Waters SFC Investigator II System using a Waters 2998 photodiode array detector and a 2-ethylpyridine column (250 × 4.6 mm, 5 $\mu$m, Princeton). Silica gel 60 (35–70 $\mu$m) and analytical TLC plates (Si gel 60 F 254) were purchased from SDS (France). A prepacked 140 g $C_{18}$ Versapak cartridge was used for flash chromatography using a Combiflash-Companion apparatus (Serlabo). All other chemicals and solvents were purchased from SDS (France).

**Computational Methods.** Conformations (2000) of 2*R*,5″*R*- and 2*R*,5″*S*-configured Chartaceone A (**1**) were generated by the Monte Carlo[27] random search method and optimized by PRCG molecular mechanics minimization[28] using the Macromodel (version 5.5) program[29] with the OPLSA* force field[30] and GB/SA $CHCl_3$ solvation. Given the large degree of conformational freedom of the side chain, the conformational search led to a large number of structures, which could be classified in two main groups: folded side chain due to a hydrogen bond between the oxygen atom of the carboxylic acid and the 7-OH hydrogen or an extended side chain. Only the two most stable conformers of each group were selected for ab initio calculations. Gradient optimizations of these four structures using the B3LYP/6-31G(d,p) basis set[31−34] have been performed with the Gaussian 03 program.[35] B3LYP calculations indicate that the two structures with hydrogen bonding are more stable (about 3 kcal/mol) than structures with the extended side chain. Consequently, for the sake of saving computational time, only structures with hydrogen bonding within a 3 kcal/mol range and the two most stable structures with the extended side chain were optimized at the B3LYP/6-31G(d,p) level. This selection was applied to both 2*R*,5″*R* and 2*R*,5″*S* configurations, leading, in each case, to a selection of six conformers. ECD calculations were performed, and, for both 2*R*,5″*R* and 2*R*,5″*S* configurations, ECD spectra predicted for the six conformations were added up with Boltzmann weighting[36] to give the calculated overall ECD spectrum. Boltzmann weighting and Gauss curve generation (using a sigma value of 0.16 eV) were done with SpecDis.[37]

**Plant Material.** The trunk bark of *C. chartacea* was collected and identified by one of us (M.L.) in May 1998 at "Port Boisé", South Province. The corresponding voucher specimen, LIT-0528, is kept at the Herbarium of the Botanical and Tropical Ecology Department of the IRD Center, Noumea, New Caledonia.

**Extraction and Isolation.** Air-dried powder of the bark (495 g) was extracted with EtOAc (3 × 1.5 L) followed by MeOH (3 × 1.5 L) at room temperature. The EtOAc crude extract was concentrated in vacuo at 40 °C to yield 6 g of extract, which were subjected to $C_{18}$ flash chromatography using a gradient of $H_2O$–MeOH–EtOAc (80:20:0 to 0:50:50) of decreasing polarity, leading to 12 fractions. Fraction 6 (144 mg; $H_2O$–MeOH, 30:70) was subjected to semipreparative HPLC on a $C_{18}$ phase using $H_2O$–MeCN (50:50) at 15 mL·min$^{-1}$ to afford pinocembrin (17.8 mg). Fraction 8 (2.3 g; $H_2O$–MeOH, 10:90) was subjected to silica gel CC using a gradient of $CH_2Cl_2$–MeOH (100:0 to 80:20) of increasing polarity, leading to 17 fractions (F1′–F17′) on the basis of TLC. Fraction 10′ (359.3 mg; $CH_2Cl_2$–MeOH, 99:1) was subjected to preparative HPLC on a C18 phase using $H_2O$–MeCN (24:76 + 0.1% $HCO_2H$) at 14 mL·min$^{-1}$ to afford pinocembrin (4.7 mg), chartaceone A (**1**; 139.1 mg), and chartaceone B (**2**; 47.6 mg). Fraction 11′ (370 mg; $CH_2Cl_2$–MeOH, 98:2) was subjected to preparative HPLC on a $C_{18}$ phase using $H_2O$–MeCN (20:80 + 0.1% $HCO_2H$) at 21 mL·min$^{-1}$ to afford chartaceone A (**1**; 30.9 mg), chartaceone C (**3**; 48.1 mg), a mixture of chartaceones D and E (104.6 mg), and chartaceone F (**6**; 86.9 mg). A mixture of chartaceones D and E (38 mg) was subjected to semipreparative SFC on an 2-ethylpyridine phase using $CO_2$–MeOH (70:30) at 10 mL·min$^{-1}$, 39.9 °C, to afford chartaceone D (**4**; 8.2 mg) and chartaceone E (**5**; 9.7 mg). Chartaceone A (**1**; 85 mg) was subjected to semipreparative HPLC on a Chiralpak AD column using *n*-heptane–EtOH (70:30 + 0.1% $HCO_2H$) to afford chartaceones A1 (**1a**; 18.9 mg), A2 (**1b**; 21.7 mg), A3 (**1c**; 19.2 mg), and A4 (**1d**; 20.5 mg). Chartaceone B (**2**; 44.9 mg) was subjected to semipreparative HPLC on a Chiralpak AD column using *n*-heptane–EtOH (70:30 + 0.1% $HCO_2H$) to afford chartaceones B1 (10 mg), B2 (7.9 mg), B3 (11 mg), and B4 (7.8 mg).

**Dengue 2 NS5 Polymerase Plasmid Constructs, Enzyme Preparation, and Reagents.** Dengue 2 NS5 polymerase genes were tagged by six *N*-terminal histidine residues and expressed from the pQE30 vector (Quiagen) in *E. coli* Rosetta pLacI cells (Novagen). The enzymes were produced and purified as previously described.[6] Homopolymeric cytosine Poly (rC) RNA template was obtained from GE-Healthcare (Mississauga, Canada). Uniformly labeled [$^3$H]GTP (5.1 Ci/mmol) was purchased from Perkin (Boston, MA, USA).

**Enzymatic Activity Assay of the Dengue Polymerase.** Polymerase activity was assayed by monitoring the incorporation of radiolabeled guanosine into a homopolymeric cytosine RNA template, as previously described.[6]

**Library Screening.** The screening was conducted on plant extracts (barks, leaves) and their fractions. Quality of measurements was assessed by calculating the *Z*′ factor for each plate: *Z*′ factor = 1 − {[3SD(neg) + 3SD(pos)]/[av(neg) − av(pos)]}, where SD(neg) and SD(pos) stand for the standard deviation obtained for negative and positive controls, respectively, and where av(neg) and av(pos) are averages for negative and positive controls, respectively. The *Z*′ factor had an average value of 0.834 with a standard deviation of 0.058 for assay plates, indicating that there is a wide separation of data points between the baseline and positive signals. For each compound, the percentage of inhibition was calculated as follows: Inhibition % = 100(raw_data_of_compound − av(pos)/(av(neg) − av(pos)). The library was organized in 96-wells plates, each containing 80 samples. Assay plates contained positive and negative controls distributed in the first and 12th columns, respectively. Our experimental screening consisted of an in vitro nucleotide incorporation assay in which a functionally active recombinant dengue NS5pol enzyme and a homopolymeric polycytosine template were used. Reactions were conducted in 20 $\mu$L volume. Positive and negative controls consisted of a reaction mixture (50 mM HEPES pH 8.0, 10 mM KCl, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 100 nM homopolymeric polycytosine RNA template, 20 nM NS5) supplemented by 10 $\mu$M [$^3$H]-GTP (0.25 $\mu$Ci) and 5% DMSO or 20 mM EDTA, respectively. For each assay, the enzyme mix was first distributed in plate wells using a BioMek 3000 workstation (Beckman). Each of 80 samples was added to the assay using a BioMek NX workstation (Beckman) to a final concentration of 50 $\mu$g/mL in 5% DMSO. Reactions were initiated by addition of 10 $\mu$M [$^3$H]-GTP (0.25 $\mu$Ci), incubated at

30 °C, and stopped after 10 min by the addition of EDTA (100 mM final concentration). All distributions were conducted with the Biomek 3000. Reaction products were then transferred onto DE-81 paper membrane (Whatman International Ltd.) with a Packard Filtermate Harvester. Filter paper membranes were washed three times in 0.3 M ammonium formate (pH 8.0), washed twice with EtOH, and dried. The radioactivity bound to the filter was determined using liquid scintillation counting (Wallac Microbeta Trilux). Fractions or pure compounds showing 80% or more reaction inhibition were selected and used to generate new experimental plates. These experimental plates were used for a second screen at a 10 $\mu$g/mL final concentration, with the same experimental procedure. Compounds leading to an 80% inhibition or more in the second screen were qualified as hits. Hits were confirmed on purified freshly solubilized compound, and their $IC_{50}$'s determined.

**$IC_{50}$ Determination.** The compound concentration leading to 50% inhibition of NS5-mediated RNA synthesis was determined in the same buffer as the screen (cf. library screening section) containing 100 nM of homopolymeric cytosine RNA template, 40 nM of NS5, and various concentrations of compound (0; 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 50 $\mu$M). Reactions incubated at 30 °C were initiated by the addition of 40 $\mu$M [$^3$H]-GTP (0.2 $\mu$Ci). After 5 min of incubation, the reaction was stopped by the addition of EDTA (100 mM final concentration). Reaction products were transferred onto a DE-81 paper membrane (Whatman International Ltd.) with a Packard Filtermate Harvester. Filter paper membranes were washed three times in 0.3 M ammonium formate (pH 8.0) and twice in EtOH and dried. Radioactivity bound to filters was determined using liquid scintillation counting (Wallac Microbeta Trilux). The residual activity for each condition was evaluated, and $IC_{50}$ was determined using the following equation: % of enzyme activity = $100/(1 + (I)^2/IC_{50})$, where $I$ is the concentration of inhibitor. $IC_{50}$ was determined from curve-fitting using Kaleidagraph (Synergy Software). For each value, results were obtained using triplicates in a single experiment.

**Cytotoxic Activity Determination.** The cytotoxic activities of the compounds were evaluated against the KB (nasopharynx human carcinoma) cell line. Cytotoxicity assays were performed according to a published procedure.[38] Taxotere was used as a reference compound ($IC_{50}$ of 15 nM on KB).

**(±)-Chartaceone A (1):** yellow, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 341 (sh) (3.6), 294 (4.26), 255 (4.36) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 457.1671 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{28}H_{25}O_6$, 457.1651).

**Chartaceone A1 (1a):** $[\alpha]^{25}_D$ +82 ($c$ 1, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.15 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 331 (−1.72), 287 (19.39), 256 (18.00), 220 (−35.05) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2.

**Chartaceone A2 (1b):** $[\alpha]^{25}_D$ −56 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.15 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 331 (−4.62), 289 (7.60), 255 (−25.51), 233 (24.68) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2.

**Chartaceone A3 (1c):** $[\alpha]^{25}_D$ +56 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.15 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 328 (3.41), 290 (−3.94), 255 (24.68), 233 (−14.16) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2.

**Chartaceone A4 (1d):** $[\alpha]^{25}_D$ −88 ($c$ 1, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.15 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 330 (2.76), 287 (−11.70), 257 (−9.25), 220 (30.02) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2.

**(±)-Chartaceone B (2):** yellow, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 341 (sh) (3.54), 294 (4.21) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 457.1653 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{28}H_{25}O_6$, 457.1651).

**Chartaceone B1:** $[\alpha]^{25}_D$ −31 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.25 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 331 (−1.42), 290 (6.16), 220 (−10.80) nm.

**Chartaceone B2:** $[\alpha]^{25}_D$ +45 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.25 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 330 (−0.74), 289 (3.10), 221 (−2.77) nm.

**Chartaceone B3:** $[\alpha]^{25}_D$ −48 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.25 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 329 (0.98), 290 (−5.06), 220 (5.02) nm.

**Chartaceone B4:** $[\alpha]^{25}_D$ +35 ($c$ 0.5, $CHCl_3$); CD (MeOH, $c$ $1.25 \times 10^{-3}$) $\lambda_{max}$ ($\Delta\varepsilon$) 329 (0.89), 288 (−4.80), 218 (8.60) nm.

**(±)-Chartaceone C (3):** yellow-orange, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 341.5 (sh) (3.60), 295.5 (3.97) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 659.2653 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{41}H_{39}O_8$, 659.2645).

**(±)-Chartaceone D (4):** brownish, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 340.5 (sh) (3.52), 294 (4.07), 254 (4.23) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 659.2689 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{41}H_{39}O_8$, 659.2645).

**(±)-Chartaceone E (5):** brownish, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 341.5 (sh) (3.51), 294.5 (4.01), 254 (4.18) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 659.2653 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{41}H_{39}O_8$, 659.2645).

**(±)-Chartaceone F (6):** yellow-orange, amorphous solid; UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 340.5 (sh) (3.76), 294 (4.24), 250 (4.48) nm; $^1$H and $^{13}$C NMR, see Tables 1 and 2; HR-ESIMS $m/z$ 659.2603 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{41}H_{39}O_8$, 659.2645).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

NMR spectra for compounds **1**−**6**, chromatograms for compounds **1** and **2**, and experimental ECD spectra for chartaceones B1−B4 are available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to South Province of New Caledonia, which facilitated our field investigation. We express our thanks to G. Aubert (ICSN), who performed the cytotoxicity assays on the KB cell line and M.-T. Martin (ICSN) for her help and advice in NMR studies. AFMB thanks the Région PACA, the Association de Recherche contre le Cancer (ARC), the Infectiopole, the Université de la Méditerranée (BQR), the Direction Générale de l'Armement (DGA), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, Aide aux Équipes) for their support. They also thank B. Selisko for her contribution as operating manager of the PCML platform and M. Blemont for the screening.

## ■ REFERENCES

(1) Guzmán, M. G.; Kourí, G. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 33−42.
(2) Guzmán, M. G.; Halstead, S. B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H. S.; Martínez, E.; Nathan, M. B.; Pelegrino, J. L.; Simmons, C.; Yoksan, S.; Peeling, R. W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 7−16.
(3) Coller, B.-A. G.; Clements, D. E. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 391−398.
(4) Malet, H.; Massé, N.; Selisko, B.; Romette, J.-L.; Alvarez, K.; Guillemot, J. C.; Tolou, H.; Yap, T. L.; Vasudevan, S.; Lescar, J.; Canard, B. *Antivir. Res.* **2008**, *80*, 23−35.
(5) Niyomrattanakit, P.; Chen, Y.-L.; Dong, H.; Yin, Z.; Qing, M.; Glickman, J. F.; Lin, K.; Mueller, D.; Voshol, H.; Lim, J. Y. H.; Nilar, S.; Keller, T. H.; Shi, P.-Y. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5678−5686.
(6) Selisko, B.; Dutartre, H.; Guillemot, J.-C.; Debarnot, C.; Benarroch, D.; Khromykh, A.; Desprès, P.; Egloff, M.-P.; Canard, B. *Virology* **2006**, *351*, 145−158.
(7) Awang, K.; Hadi, A. H. A.; Saidi, N.; Mukhtar, M. R.; Morita, H.; Litaudon, M. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 308−310.
(8) Toribio, A.; Bonfils, A.; Delannay, E.; Prost, E.; Harakat, D.; Henon, E.; Richard, B.; Litaudon, M.; Nuzillard, J. M.; Renault, J. H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3825−3828.
(9) Cavalheiro, A. J.; Yoshida, M. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 811−819.
(10) Drewes, S. E.; Sehlapelo, B. M.; Horn, M. M.; Scott-shawt, R.; Sandor, P. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1427−1430.
(11) Chou, T.-H.; Chen, J.-J.; Lee, S.-J.; Chiang, M. Y.; Yang, C.-W.; Chen, I.-S. *J. Nat. Prod.* **2010**, *5*, 6−11.
(12) Fu, X.; Sévenet, T.; Remy, F.; Païs, M.; Hadi, A. H. A.; Zeng, L. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1153−1163.

(13) Dumontet, V.; Gaspard, C.; Van Hung, N.; Fahy, J.; Tchertanov, L.; Sévenet, T.; Guéritte, F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6189−6196.
(14) Dumontet, V.; Van Hung, N.; Adeline, M. T.; Riche, C.; Chiaroni, A.; Sévenet, T.; Guéritte, F. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 858−862.
(15) Wang, K.; Hu, Y.; Liu, Y.; Mi, N.; Fan, Z.; Liu, Y.; Wang, Q. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12337−12342.
(16) Yang, C.-W.; Lee, Y.-Z.; Kang, I.-J.; Barnard, D. L.; Jan, J.-T.; Lin, D.; Huang, C.-W.; Yeh, T.-K.; Chao, Y.-S.; Lee, S.-J. *Antivir. Res.* **2010**, *88*, 160−168.
(17) Min, H.-Y.; Chung, H.-J.; Kim, E.-H.; Kim, S.; Park, E.-J.; Kook, S. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1356−1364.
(18) Chen, Y.-C.; Kung, F.-L.; Tsai, I.-L.; Chou, T.-H.; Chen, I.-S.; Guh, J.-H. *J. Urol.* **2010**, *183*, 2409−2418.
(19) Andersen, Ø. M.; Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*; CRC Press, 2006; p 917.
(20) Lewis, F. D.; Zuo, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8806−8813.
(21) Slade, D.; Ferreira, D.; Marais, J. P. J. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2177−2215.
(22) Gaffield, W. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4093−4108.
(23) Su, B.-N.; Park, E. J.; Vigo, J. S.; Graham, J. G.; Cabieses, F.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 335−341.
(24) Ding, Y.; Li, X.-C.; Ferreira, D. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9010−9017.
(25) Ding, Y.; Li, X.-C.; Ferreira, D. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 327−335.
(26) Prasain, J.; Li, J.; Tezuka, Y.; Tanaka, K.; Basnet, P.; Dong, H.; Namba, T.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 212−216.
(27) Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379−4386.
(28) Polak, E.; Ribiere, G. *Rev. Fr. Inform. Rech. O.* **1969**, *3*, 35−43.
(29) Mohamadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440−467.
(30) Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657−1666.
(31) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
(32) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213−222.
(33) Petersson, G.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M.; Shirley, W.; Mantzaris, J. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193−2218.
(34) Petersson, G. A.; Al-Laham, M. A. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081−6091.
(35) Frisch, M. J. Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian03, revision C.02*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
(36) Bringmann, G.; Bruhn, T.; Maksimenka, K.; Hemberger, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2717−2727.
(37) Bruhn, T.; Hemberger, Y.; Schaumlöffel, A.; Bringmann, G. *SpecDis*, Version 1.51; University Würzburg: Würzburg, Germany, 2011.
(38) Tempête, C.; Werner, G.; Favre, F.; Rojas, A.; Langlois, N. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 647−650.

ORGANIC LETTERS

XXXX
Vol. XX, No. XX
000–000

# Trigocherrin A, the First Natural Chlorinated Daphnane Diterpene Orthoester from *Trigonostemon cherrieri*

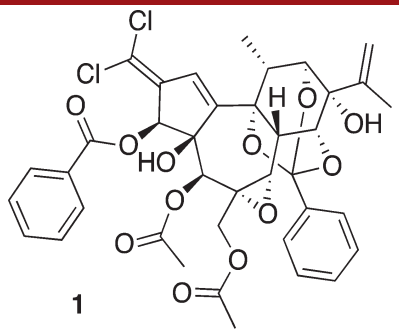
**Pierre-Marie Allard,[†] Marie-Thérèse Martin,[†] Marie-Elise Tran Huu Dau,[†] Pieter Leyssen,[‡] Françoise Guéritte,[†] and Marc Litaudon*[,†]**

*Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France, and Katholieke Universiteit Leuven, Rega Institute for Medical Research, Minderbroedersstraat 10, 3000 Leuven, Belgium*

*marc.litaudon@icsn.cnrs-gif.fr*

**Received November 18, 2011**

## ABSTRACT




1

**Trigocherrin A, a chlorinated and highly oxygenated daphnane diterpenoid orthoester (DDO), was isolated from the bark of *Trigonostemon cherrieri*. Trigocherrin A is the first example of a naturally occurring halogenated DDO. Its structure was elucidated by comprehensive analysis of NMR spectroscopic data, and its absolute configuration was determined by comparison of experimental and theoretically calculated ECD spectra. Trigocherrin A exhibited a potent and selective effect against Chikungunya virus in Vero cells.**

In an effort to identify selective inhibitors of virus replication from tropical plants, the bark of *Trigonostemon cherrieri* Veillon, a tree collected in the sclerophyllous forest of New-Caledonia, was chemically investigated. This species, which is classified as critically endangered by the IUCN red list,[1] is the unique representative of the genus *Trigonostemon* (Euphorbiaceae) in New Caledonia. It only grows in a small parcel of ca. 20 ha of dry forest located on the west coast of the main island. This genus comprises about 80 species occurring in tropical Asia, from India and Sri Lanka to New Guinea.[2] Previous investigations of species of this genus led to the isolation of numerous structurally interesting compounds such as flavonoidal alkaloids,[3] alkaloids,[4] phenanthrenes,[4a,5] and an array of daphnane-type diterpenoids.[6] Daphnane-type diterpenoids have been reported to possess insecticidal,[6a,b] acaricidal,[6c] cytotoxic,[6g,h,j] and antiviral[6d,e] properties.

In this study, trigocherrin A (**1**),[7] an unusual chlorinated daphnane diterpenoid orthoester (DDO) was isolated from the bark of *Trigonostemon cherrieri*. Theoretical calculation of electronic circular dichroism (ECD) spectra and comparison with experimental data allowed determination of the absolute configuration of **1**. Herein, we report the isolation, structure determination, configurational

[†] Institut de Chimie des Substances Naturelles.
[‡] Rega Institute for Medical Research.

(1) http://www.iucnredlist.org/.

(2) Fan, D.; Ju, H.; Shao-Yong, Y.; Xia, C.; Da-Cai, Z.; Ye-Na, T. *Kew Bull.* **2010**, *65*, 111–113.

(3) Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Chumsri, P.; Kraisintu, K.; Yamasaki, K. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2941–2943.

(4) (a) Zhu, Q.; Tang, C.-P.; Ke, C.-Q.; Li, X.-Q.; Liu, J.; Gan, L.-S.; Weiss, H.-C.; Gesing, E.-R.; Ye, Y. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 40–4. (b) Tan, C.-J.; Di, Y.-T.; Wang, Y.-H.; Zhang, Y.; Si, Y.-K.; Zhang, Q.; Gao, S.; Hu, X.-J.; Fang, X.; Li, S.-F.; Hao, X.-J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2370–3.

(5) Kokpol, U.; Thebpatiphat, S.; Boonyaratavej, S.; Chedchuskulcai, V.; Ni, C.-Z.; Clardy, J.; Chaichantipyuth, C.; Chittawong, V.; Miles, D. H. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1148–1151.

10.1021/ol2030907 © XXXX American Chemical Society

study, and antiviral activity in a Chikungunya virus-cell-based assay of trigocherrin A (**1**).

The air-dried powder of the bark of *Trigonostemon cherrieri* (1.2 kg) was extracted manually at room temperature with EtOAc (5 L) and MeOH (5 L). The EtOAc extract (23 g) was partioned between *n*-hexanes and aqueous MeOH. The MeOH-soluble fraction (4.2 g) was then subjected to C18 Flash chromatography using a $H_2O$/MeOH (0.1% $HCO_2H$) gradient (80:20 to 0:100) to afford 20 fractions. Fraction 11 (20:80, 315 mg) was then repeatedly purified by preparative and analytical HPLC ($H_2O$:$CH_3CN$ + 0.1% $HCO_2H$) to yield compound **1** (1.9 mg).

Compound **1** was obtained as an amorphous powder. The HRESIMS of the quasi-molecular positive ion peak at *m*/*z* 755.1657 established the molecular formula of **1** as $C_{38}H_{36}Cl_2O_{12}$ (calcd. 775.1662), thus requiring a 20 double-bond equivalent. The 3:2 ratio of $[M + H]^+$ and $[M + H + 2]^+$ confirmed the presence of two chlorine atoms in **1**. In accordance with the molecular formula, 38 carbons were resolved in the $^{13}C$ NMR spectrum (Table 1) and were further characterized by HSQC experiment as four methyls, two methylenes (one olefinic), 18 methines (5 oxygenated and 11 olefinic), and 14 quaternary carbons (3 ester carbonyls, 5 oxygenated, and 6 olefinic). The $^1H$ NMR spectrum (Table 1) clearly showed the presence of an isopropenyl (C-15 ($\partial_C$ 141.8), C-16 ($\partial_C$ 116.1), C-17 ($\partial_C$ 18.5); H-16 ($\partial_H$ 4.93 and 5.19, s, 2H), H-17 ($\partial_H$ 1.82, s, 3H)), an oxymethylene (C-20 ($\partial_C$ 66.5); H-20 ($\partial_H$ 3.52 and 4.76, d, 12.2 Hz, 2H)), two acetyls ($\partial_H$ 2.06, s, 3H and 2.32, s, 3H), two hydroxyls ($\partial_H$ 2.97, s and $\partial_H$ 3.88, br s), and a benzoyloxy group. The quaternary carbon C-1′ at $\partial_C$ 108.5 is typical of an orthobenzoate.[8] Considering its biological source, the aforementioned data suggested that **1** possessed a modified DDO backbone. The DDO nature and the relative configuration of **1** were established by comprehensive 1D and 2D NMR data analysis (Figures 1 and 2).

**Table 1.** $^1H$ and $^{13}C$ NMR Data of Trigocherrin A (**1**) ($CDCl_3$)

| position | $\partial_C$[a] | $\partial_H$, mult (*J* in Hz)[b] |
|---|---|---|
| 1 | 128.4 | 6.41, s |
| 2 | 136.6 | – |
| 3 | 79.1 | 5.62, s |
| 4 | 84.5 | – |
| 5 | 69.8 | 5.50, s |
| 6 | 59.4 | – |
| 7 | 62.8 | 3.28, s |
| 8 | 34.9 | 3.43, s |
| 9 | 74.6 | – |
| 10 | 146.9 | – |
| 11 | 35.9 | 1.99, q (7.0) |
| 12 | 79.7 | 4.25, br s |
| 13 | 70.4 | – |
| 14 | 79.3 | 4.44, br s |
| 15 | 141.8 | – |
| 16 | 116.1 | 5.19, s |
| | | 4.93, s |
| 17 | 18.5 | 1.82, s |
| 18 | 13.8 | 1.20, d (7.0) |
| 19 | 120.2 | – |
| 20a | 66.5 | 4.76, d (12.2) |
| 20b | | 3.52, d (12.2) |
| 1′ | 108.5 | – |
| 2′ | 137.9 | – |
| 3′ | 125.5 | 7.74, m |
| 4′ | 128.4 | 7.40, m |
| 5′ | 129.9 | 7.40, m |
| 6′ | 128.4 | 7.40, m |
| 7′ | 125.5 | 7.74, m |
| 1″ | 168.1 | – |
| 2″ | 129.3 | – |
| 3″ | 130.1 | 7.98, d (7.6) |
| 4″ | 128.8 | 7.45, t (7.6) |
| 5″ | 133.8 | 7.59, t (7.6) |
| 6″ | 128.8 | 7.45, t (7.6) |
| 7″ | 130.1 | 7.98, d (7.6) |
| 4-OH | – | 2.97, s |
| 13-OH | – | 3.88, br s |
| 5-OAc | 170.1, 21.2 | 2.32, s |
| 20-OAc | 170.9, 21.0 | 2.06, s |

[a] Data recorded at 150 MHz. [b] Data recorded at 600 MHz.

The secondary methyl at $\partial_C$ 13.8 was assigned to Me-18 by HMBC correlations from Me-18 to C-9, C-11, and C-12. The presence of a trisubstituted 6,7-epoxide was determined by chemical shifts of C-6 and C-7 ($\partial_C$ 59.4 and 62.8, respectively) and multiple HMBC correlations from H-7 to C-6, C-8, C-9, and C-20; from H-20 to C-7; and from H-8 to C-6 and C-7. The benzoyloxy group was attached to C-3 ($\partial_C$ 79.1) by the HMBC correlation from H-3 ($\partial_H$ 5.62, s) to the carbonyl C-1″ ($\partial_C$ 168.1). The two acetoxyls were located at C-5 ($\partial_C$ 69.8) and C-20 ($\partial_C$ 66.5), on the basis of HMBC correlations from H-5 and H-20 to the corresponding carbonyls of the acetyls at $\partial_C$ 170.1 and 170.9, respectively. The two hydroxyl protons at $\partial_H$ 2.97 and 3.88 were assigned as 4-OH and 13-OH on the basis of their correlation with C-4 ($\partial_C$ 84.5) and C-13 ($\partial_C$ 70.4), respectively. The three remaining oxygenated carbons

(6) (a) Jayasuriya, H.; Zink, D. L.; Singh, S. B.; Borris, R. P.; Nanakorn, W.; Beck, H. T.; Balick, M. J.; Goetz, M. A.; Slayton, L.; Gregory, L.; Zakson-Aiken, M.; Shoop, W.; Singh, S. B. *J. Am. Chem. Soc*. **2000**, *122*, 4998–4999. (b) Jayasuriya, H.; Zink, D. L.; Borris, R. P.; Nanakorn, W.; Beck, H. T.; Balick, M. J.; Goetz, M. A.; Gregory, L.; Shoop, W. L.; Singh, S. B. *J. Nat. Prod*. **2004**, *67*, 228–31. (c) Soonthornchareonnon, N.; Sakayarojkul, M.; Isaka, M.; Mahakittikun, V.; Chuakul, W.; Wongsinkongman, P. *Chem. Pharm. Bull*. **2005**, *53*, 241–243. (d) Zhang, L.; Luo, R. H.; Wang, F.; Jiang, M. Y.; Dong, Z. J.; Yang, L. M.; Zheng, Y. T.; Liu, J. K. *Org. Lett*. **2010**, *12*, 152–5. (e) Zhang, L.; Luo, R. H.; Wang, F.; Dong, Z. J.; Yang, L. M.; Zheng, Y. T.; Liu, J. K. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1879–1883. (f) Chen, H. D.; Yang, S. P.; He, X. F.; Ai, J.; Liu, Z. K.; Liu, H. B.; Geng, M. Y.; Yue, J. M. *Org. Lett*. **2010**, *12*, 1168–71. (g) Lin, B. D.; Han, M. L.; Ji, Y. C.; Chen, H. D.; Yang, S. P.; Zhang, S.; Geng, M. Y.; Yue, J. M. *J. Nat. Prod*. **2010**, *73*, 1301–5. (h) Chen, H. D.; Yang, S. P.; He, X. F.; Liu, H. B.; Ding, J.; Yue, J. M. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5065–5070. (i) Li, S. F.; Di, Y. T.; Li, S. L.; Zhang, Y.; Yang, F. M.; Sun, Q. Y.; Simo, J. M.; He, H. P.; Hao, X. J. *J. Nat. Prod*. **2011**, *74*, 464–9. (j) Dong, S. H; Zhang, C. R.; Xu, C. H.; Ding, J.; Yue, J. M. *J. Nat. Prod*. **2011**, *74*, 1255–61.

(7) Trigocherrin A (**1**): amorphous powder, $[\alpha]^{25}_D$ −150 (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$ (log $\varepsilon$) 267 (4.01) 233 (3.87) nm; $^1H$ and $^{13}C$ NMR data: see Table1; HRESIMS (pos.) *m*/*z* 755.1657 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{37}Cl_2O_{12}$, 775.1662).

(8) Liao, S. G.; Chen, H. D.; Yue, J. M. *Chem. Rev*. **2009**, *109*, 1092–140.

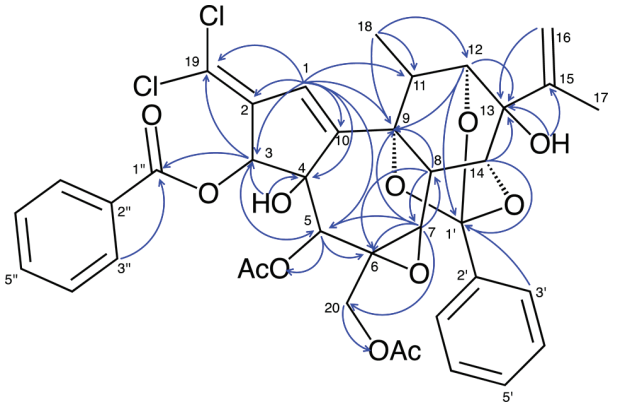



**Figure 1.** Selected HMBC (blue →) correlations of **1**.

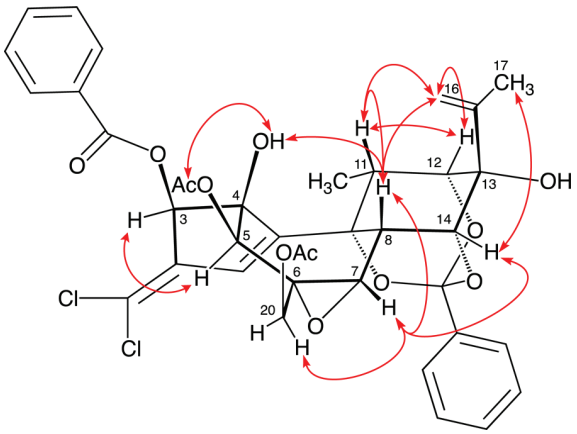



**Figure 2.** Key (red ↔) ROESY correlations of **1**.

were assigned to C-9 ($\partial_C$ 74.6), C-12 ($\partial_C$ 79.7), and C-14 ($\partial_C$ 79.3), and formed a 9,12,14-orthobenzoate pattern as confirmed by HMBC correlations from H-12, H-14, H-3′, and H-7′ to the characteristic quaternary C-1′ at $\partial_C$ 108.5. The location of the aforementioned substituents left two double-bond equivalents and two chlorine atoms to dispose on the five-membered ring of the daphnane core, thus implying the presence of an insaturation between C-1 and C-10, and an exocyclic double bond bearing the two Cl atoms. Multiple HMBC correlations from H-1 to C-2, C-3, C-4, C-5, C-9, C-10, C-11, and C-19 secured the planar structure of **1**.

The relative configuration of **1** was established by ROESY experiment (Figure 2). The ROESY cross peaks of H-12/H-11, H-11/H-8, H-8/OH-4, OH-4/OAc-5, H-20b/H-7, H-7/H-8, and H-7/H-14 indicated that they were all cofacial and randomly assigned as *β*-oriented. The strong intensity of the H-3/H-5 correlation allowed us to determine H-3 and H-5 as α-oriented. However, as observed in the case of trigochilide A,[9] a weaker ROESY correlation of H-3 with OH-4 was also observed. Correlation of H-14/Me-17 and multiple correlations of $H_2$-16 with H-8, H-11, and H-12 suggested the axial position of the isopropenyl at C-13. The relative stereochemistry of **1** was consequently established as 3*S**, 4*R**, 5*R**, 6*S**, 7*S**, 8*S**, 9*R**, 11*R**, 12*S**, 13*S**, 14*R** (Figure 2).

In order to determine the absolute configuration of **1**, its theoretically calculated and experimental ECD curves were compared. A conformational study on the 3*S*, 4*R*, 5*R*, 6*S*, 7*S*, 8*S*, 9*R*, 11*R*, 12*S*, 13*S*, 14*R*-configured trigocherrin A was performed.[10] Hybrid methods taking into account experimental data in the process of quantum mechanics calculations have proven themselves to be successful in the theoretical simulation of ECD spectra.[11]

Therefore, 1000 conformations were generated by a Monte Carlo random search method and optimized by a TNCG method using the Macromodel program with the MM2 force field. Among the generated conformations and within a range of 3 kcal/mol from the global minimum, the conformer consistent with ROESY NMR experimental data was retained. ECD calculation was performed after gradient optimization of the selected conformer using the TDDFT method at the B3LYP/6-31G(d,p) level. The calculations were performed on the *Gaussian03* program, and an ECD curve was generated using SpecDis (Figure 3).

Comparison of theoretically calculated and experimental ECD curves permitted the unambiguous assignment

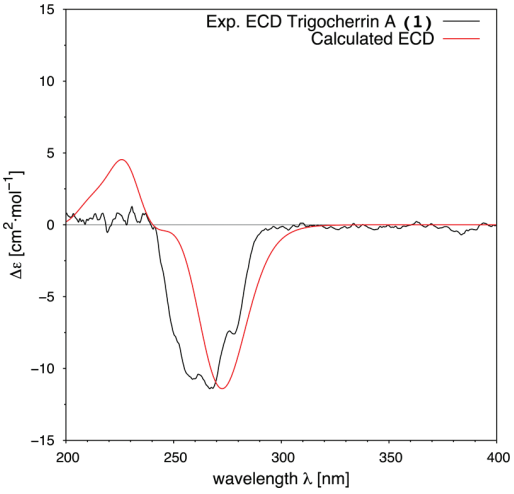



**Figure 3.** Experimental and calculated ECD for **1**.

of the absolute configuration of **1** as 3*S*, 4*R*, 5*R*, 6*S*, 7*S*, 8*S*, 9*R*, 11*R*, 12*S*, 13*S*, 14*R*.

Since no chlorinated solvent was used for extraction or purification, the nonartifactual nature of **1** could be

(9) Chen, H.-D.; He, X.-F.; Ai, J.; Geng, M.-Y.; Yue, J.-M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4080–3 (Supporting Information p S8).

(10) Details about the computational methods as well as the TDDFT-optimized geometry of **1** are available in the Supporting Information.

(11) Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914–31.

established. Furthermore, characteristic M + 2 isotopic patterns were observed in the LC-MS chromatogram of the crude EtOAc extract, indicating the presence of chlorinated compounds in the bark. Halogenation is a structural feature that has been encountered in more than 4500 natural products. If most organohalogens are common in marine organisms, they are more rarely isolated from higher plants.[12] To our knowledge, all halogenated terrestrial diterpenes reported in the literature were chlorohydrins. Thus, trigocherrin A (**1**), possessing an α,β-unsaturated dichlorovinyl moiety, represents the first member of a new class of chlorinated diterpene. While most biohalogenases require aromatic, electron-rich substrates,[13] a class of enzyme recently reported by Vaillancourt et al. is shown to be capable of carrying out halogenation at aliphatic, unactivated carbon centers.[14] These nonheme iron, $O_2$, α-ketoglutarate-dependent halogenases catalyze the addition of a radical Cl• species on an aliphatic carbon. They can perform multiple chlorinations, as it is the case in the biosynthesis of barbamide,[15] and are thought to be responsible for vinyl chloride formation in the cyanobacterial metabolite jamaicamide.[16] A chlorination mechanism leading to **1** could involve such a nonheme iron halogenase to catalyze radical Cl• addition on carbon C-19. Validation of this biogenetic hypothesis would require a thorough biochemical study of the plant's genetic material.

Compound **1** reproducibly inhibited Chikungunya virus-induced cell death in a virus-cell-based assay with an $EC_{50}$ of 1.5 ± 0.6 μM and only caused a significant antimetabolic effect at a concentration of 35 ± 8 μM ($CC_{50}$), allowing us to calculate a selectivity index (SI or window for antiviral selectivity) of 24. Following microscopic quality control, several concentrations of compound were found to perfectly protect the host cells from the virus-induced cytopathic effect without showing any adverse effects. For the reference compound chloroquine, a $CC_{50}$ and $EC_{50}$ of respectively 89 ± 28 μM and 11 ± 7 μM were obtained, resulting in an SI of 8, indicating that compound **1** is a 3-fold more potent antiviral.

In conclusion, trigocherrin A is the first member of a new series of chlorinated DDO with a potent and selective effect on Chikungunya virus-induced cell death. The structures and biological activities of this chemical series will be reported later on. The discovery of original bioactive compounds from a threatened biotope highlights the urgency to protect the unique habitat that is the sclerophyllous forests of New Caledonia.

**Acknowledgment.** The authors are very grateful to South Province of New Caledonia (Dry Forest Conservation Program) and M. Metzdorf, owner of the parcel of dry forest, who facilitated our field investigations. We thank Cyril Poullain (CNRS) for the collection and Jean-Marie Veillon (IRD) for the identification of the plant material. We are also grateful to Prof. J.-Y. Lallemand (CNRS) for the fellowship (P.-M.A.). We also would like to acknowledge Stijn Delmotte, Tom Bellon, Mieke Flament, and Annelies Deceulaer for their excellent help in the acquisition of the antiviral data.

**Supporting Information Available.** Experimental procedures, computational methods, TDDFT-optimized geometry, and 1D and 2D NMR spectra of **1**. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

(12) Gribble, G. W. *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*; Springer: 2010; p 613.
(13) Blasiak, L. C.; Drennan, C. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 147–55.
(14) Vaillancourt, F. H.; Yeh, E.; Vosburg, D. A.; O'Connor, S. E.; Walsh, C. T. *Nature* **2005**, *436*, 1191–4.
(15) Galonić, D. P.; Vaillancourt, F. H.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3900–1.
(16) Vaillancourt, F. H.; Yeh, E.; Vosburg, D. A.; Garneau-Tsodikova, S.; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3364–78.

Dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5 du virus de la dengue (DENV), un criblage a été mené sur 650 plantes néo-calédoniennes. A la suite de ce criblage, deux espèces (*Cryptocarya chartacea* Kostermans et *Trigonostemon cherrieri* Veillon) ont été sélectionnées. L'extrait AcOEt des écorces de *Cryptocarya chartacea* (Lauraceae) a montré une forte inhibition de la NS5 polymérase (99 % à 10 µg/ml). L'étude phytochimique de l'extrait a mis en évidence une série de nouvelles flavanones 6-mono et 6,8-dialkylées, nommées chartacéones. Celles-ci sont présentes sous forme de mélanges racémiques au sein de *C. chartacea.* La chartacéone A a été purifiée sur colonne chirale conduisant à l'isolement de quatre diastéréoisomères optiquement purs. Une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de dichroïsme circulaire a permis la détermination de leur configuration absolue. Les chartacéones inhibent de façon sélective la NS5 polymérase du DENV. L'étude des extraits AcOEt des écorces et du bois de *Trigonostemon cherrieri* (Euphorbiaceae) a mis en évidence une série de métabolites secondaires originaux de type Diterpènes Daphnane Orthoester (DDO) chlorés : les trigocherrines (non-macrocycliques) et les trigocherriolides (macrocycliques). Ces composés ont montré une inhibition de l'activité enzymatique de la NS5 polymérase du DENV et une activité antivirale sur le virus du chikungunya *in cellulo.*

In order to identify new inhibitors of the dengue virus (DENV) NS5 RNA polymerase, a screening was led on 650 new-caledonian plants. Two species, *Cryptocarya chartacea* Kostermans and *Trigonostemon cherrieri* Veillon were selected. The EtOAc bark extract of *Cryptocarya chartacea* (Lauraceae) showed a potent inhibition of the NS5 polymerase activity (99 % at 10 µg/ml). The phytochemical study of the extract led to the isolation of a series of new 6-mono and 6,8-dialkylated flavanones, called chartaceones. Chartaceones are present as racemic mixtures in the plant. Chartaceone A was purified on chiral column leading to the isolation of 4 optically pure diastereoisomers. A configurational study based on the theoretical calculation of circular dichroism spectra allowed the determination of their absolute configuration. Chartaceone are selective inhibitors of the DENV NS5 polymerase. The study of the EtOAc extract from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri* (Euphorbiaceae) led to the isolation of a series of unusual chlorinated daphnane diterpene orthoesters (DDO) : trigocherrins (non macrocylic) and trigocherriolides (macrocyclic). These compounds inhibit the DENV NS5 polymerase activity and present an antiviral activity on the chikungunya virus *in cellulo*.

**Laboratoire de rattachement :**

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)
1, avenue de la Terrasse
91190 GIF SUR YVETTE

**PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Université Paris-Sud 11
UFR « Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex